N° D'ORDRE :
15

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
Mention Sciences

PAR

PIERRE CAYROL

Ingénieur - Chimiste
(E. C. B.)

1re THÈSE. — RECHERCHES SUR L'ACTION DES ACIDES HALOGÉNÉS ET DE LEURS ESTERS SUR LES CELLULES DE LEVURE

2me THÈSE. — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Thèses soutenues le Samedi 6 Janvier 1934 devant la Commission d'Examen

---

JURY :

Président ..... MM. KIRRMANN, professeur

Examinateurs ..... GENEVOIS, professeur
TRUCHET, professeur

PARIS
GASTON DOIN & Cie, ÉDITEURS

1933

N° D'ORDRE :
15

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
Mention Sciences

PAR

PIERRE CAYROL

Ingénieur - Chimiste
(E.C.B.)

1re THÈSE. — RECHERCHES SUR L'ACTION DES ACIDES HALOGÉNÉS ET DE LEURS ESTERS SUR LES CELLULES DE LEVURE

2me THÈSE. — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Thèses soutenues le Samedi 6 Janvier 1934 devant la Commission d'Examen

---

JURY :

Président	MM.	KIRRMANN, professeur
Examinateurs		GENEVOIS, professeur
		TRUCHET, professeur

PARIS
GASTON DOIN & Cie, ÉDITEURS

1933

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen	CHAINE	Anatomie comparée et Embryogénie.
Doyens honoraires	PADÉ	Recteur de l'Académie de Dijon.
	PICART	Astronomie.
	DUPONT	Chimie industrielle.
Professeurs honoraires	BÉNARD.	
	VÈZES.	
	VIGOUROUX.	
	SAUVAGEAU.	
	DEVAUX.	
	BOUNHIOL.	
	RICHARD.	
Professeurs	MILLOUX	Calcul infinitésimal.
	PICART	Astronomie.
	GUINCHANT	Physique générale.
	TRUCHET	Chimie organique.
	CHAINE	Anatomie comparée et Embryogénie.
	TROUSSET	Mécanique rationnelle.
	MERCIER	Physique expérimentale.
	DAGUIN	Géologie et Minéralogie.
	DAURE	Physique.
	KIRRMANN	Chimie minérale et Chimie physique.
	FEYTAUD	Zoologie.
	DANGEARD	Botanique.
	GENEVOIS	Chimie biologique et Physiologie végétale
Maîtres de conférences	N.	Chimie.
	AVEL	Zoologie.
	GARD	Botanique.
Maître de conf. honoraire	MANVILLE.	
Maître de conf. adjoint	ARRIVAUT.	
Secrétaire	ARTIGUELONG.	

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A Monsieur le Professeur A. Mayer

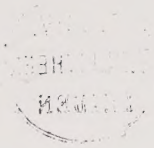
Professeur d'Histoire Naturelle des Corps Organisés
au Collège de France

Hommage de ma respectueuse gratitude.

A mon Maître,
Monsieur le Professeur L. Genevois

Professeur de Chimie Biologique
et de Physiologie végétale à la Faculté des Sciences de Bordeaux

Hommage de ma profonde et reconnaissante admiration.



A mon Père et à ma Mère

En témoignage de ma plus tendre affection.

A mon Frère

A mes Amis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543914_0058

Extrait des *Annales de Physiologie et de Physicochimie biologique*
Tome IX. — N° 5. — 1933.

Reçu le 8 Avril 1933.

Recherches sur l'action des acides halogénés et de leurs esters sur les cellules de levures.

par P. CAYROL

INTRODUCTION.

L'action physiologique des acides halogénés a donné lieu récemment à de nombreux mémoires. SCHWARTZ et OSCHMANN, à Stasbourg, ont noté dès 1926, l'arrêt de la formation d'acide dans le muscle contracturé par l'acide bromacétique. Sans connaître ce travail, E. LUNDSGAARD, en 1930, a montré que la fermentation alcoolique de la levure, aussi bien que la fermentation lactique du muscle, étaient inhibées par des concentrations très faibles en acide monoiodacétique, de l'ordre de N/2000. L'inhibition est spécifique : le muscle continue à respirer, à se contracter, aux dépens de l'hydrolyse de l'acide créatinephosphorique ; la levure continue à respirer, à se multiplier aux dépens de la respiration. L'action des acides halogénés présente donc deux caractères remarquables : une grande énergie, correspondant à des dilutions rarement employées, même pour les antiseptiques les plus violents, une extraordinaire spécificité, dont on ne connaissait jusqu'ici qu'un exemple, l'arrêté de la respiration cellulaire par de faibles concentrations en K-C-N, ou de fortes concentrations en CO.

Les acides halogénés constituent donc un réactif des plus précieux permettant de pénétrer dans l'intimité du chimisme de la cellule, cela sans la tuer, presque sans l'altérer. Une étude approfondie des propriétés de ces corps et de leur dérivés ne peut qu'apporter des données nouvelles sur le fonctionnement chimique des cellules vivantes. C'est pourquoi j'ai, sur la proposition de M. GENEVOIS, repris l'étude des dérivés halogénés dès novembre 1930. A cette époque, la connaissan-

ce de l'action de ces corps sur la levure se bornait à deux brèves notes de LUNDSGAARD. L'action de l'acide monobromacétique n'avait même jamais été publiée, LUNDSGAARD n'ayant travaillé que sur l'acide monoiodacétique. La généralisation de l'un à l'autre de ces deux corps n'était pas tout à fait évidente, les propriétés de ces deux corps diffèrent en plusieurs points, l'acide iodacétique, en solution aqueuse, ou surtout alcoolique, libère rapidement de l'iode, tandis que les solutions d'acide bromacétique ne libèrent que de l'acide bromhydrique.

Dès juin 1931, je pouvais, en collaboration avec M. GENEVOIS, montrer qu'il était possible de cultiver quantitativement des levures diverses en présence de quantités d'acide monobromacétique suffisantes pour arrêter toute fermentation. La notion d'inhibition spécifique d'une fonction de la cellule vivante recevait ainsi une éclatante confirmation qui n'a été que généralisée par la suite. Non seulement la cellule de levure peut croître sans ferment comme diverses expériences sur des levures sauvages de la collection de M. GUILLIERMOND l'ont confirmé, mais encore la cellule animale peut se passer de fermenter, comme des expériences *in vivo* de J. BRISOU l'ont tout récemment montré. Il nous faut ainsi, en plein accord avec les expériences de LUNDSGAARD et MEYERHOF sur la contraction musculaire sans fermentation lactique, considérer la fermentation alcoolique ou lactique, pour les cellules anaérobies facultatives, comme un moteur de secours, dont la cellule peut entièrement se passer si les conditions du milieu l'y obligent. Etant donné que, chez les cellules de levures et les cellules cancéreuses, la croissance peut se faire aux dépens de la seule fermentation, il nous faut admirer la souplesse du jeu de la cellule, qui peut presqu'instantanément passer de la fermentation seule à la respiration seule comme réaction produisant l'énergie nécessaire à la croissance.

A côté de ces recherches de physiologie générale, il importait de savoir quels corps possèdent les propriétés de l'acide bromacétique et de l'acide iodacétique, les acides chlorés, les acides halogénés supérieurs, les esters halégénés ont été étudiés : les dérivés chlorés, les acides gras supérieurs, sont beaucoup moins actifs que les acides bromacétiques et iodacétiques. Par contre, tous les esters de l'acide bromacétique, quel que soit le poids moléculaire et la nature de l'alcool, sont

également actifs, aux mêmes concentrations que l'acide bromacétique, N/4000 et au-dessus. Cette action est différente de celle de l'acide bromacétique : les cellules sont tuées par les bromacétates organiques, respiration et croissance sont annulées en même temps que la fermentation.

Cette action anticryptogamique des bromacétates organiques était entièrement inconnue. Elle est fondée sur l'étude de plus de dix bromacétates organiques, dont plusieurs nouveaux en chimie.

Cétones et aldéhydes bromées sont presque aussi actives que l'acide bromacétique, comme l'ont montré récemment Kirrmann et Genevois (1933). Par contre, les alcools bromés ou iodés, divers uréides, sont sons action, ainsi que je l'ai signalé dès septembre 1931. L'existence du groupement $CH^2XC = OR$ est indispensable à l'action pharmacologique des dérivés, où X représente Br ou I.

Enfin, j'ai montré en collaboration avec L. Genevois en 1932, que la cystéine renforce considérablement l'action de l'acide bromacétique, aux dilutions énormes de N/10.000, et N/50.000, alors que tous les autres acides aminés ont une action inverse.

Les acides bromacétiques et leurs esters réagissent à la température ordinaire en milieu aqueux très étendu avec un grand nombre de corps : sulfites, hyposulfites, amines simples et complexes.

Un certain nombre de mesures cinétiques ont été publiées. Il est extrêmement instructif de comparer les concentrations limites d'activité des divers acides, avec les constantes de dissociation, d'hydrolyse, de vitesse de réaction avec sulfites et hyposulfite, et des coefficients de partage : toluène, eau, etc. Il apparaît alors un parallélisme chimique grossier, mais frappant néanmoins entre certaines constantes de vitesse de réaction (sulfites hyposulfite) et les propriétés physiologiques. C'est la preuve que les bromacétates réagissent chimiquement. Cette réaction est peut-être une réaction sur les fonctions amines de la cellules ; en tous cas, les divers aminés organiques, et surtout l'hexa-méthylène-tetramine, bloquent l'action des dérivés halogénés. Il est ainsi possible d'atteindre la cellule vivante dans ses fonctions essentielles, sans la détruire, en la mettant en contact avec un réactif chimique suffisamment sensible et spécifique.

SOMMAIRE.

1° Introduction.

Chapitre I. — Propriétés chimiques des corps étudiés

A. Propriétés des acides gras halogénés.

1. Préparation.
2. Solubilité.
3. Dissociation de la fonction acide.
4. Hydrolyse de l'halogène.
5. Méthode de dosage.
6. Réaction de l'halogène vis-à-vis d'autres acides.
7. Combinaison avec les dérivés azotés.

B. Propriétés des esters d'acides gras halogénés.

1. Propriétés physiques.
2. Saponification et hydrolyse.
3. Propriétés de l'halogène.
4. Combinaison avec les substances azotées.

Chapitre II. — Inhibition de la fermentation alcoolique par les acides halogènes.

A. Historique.

B. Inhibition de la fermentation alcoolique par l'acide monobromacétique.

1. Concentration en acide bromacétique.
2. Concentration en levure.
3. Concentration en sucre.
4. pH.
5. Concentration en phosphate.
6. Diverses races de levures. Rôle du facteur Z.
7. Réversibilité de l'inhibition.

C. Inhibition de la fermentation alcoolique par divers acides halogénés.

1. Les divers acides chloracétiques.
2. L'acide monoidacétique.
3. Divers acides gras bromés.

D. Action des cétones et des aldéhydes halogénées.

E. Absence d'action de divers corps halogénés.

F. Lois générales d'action de ces corps.

CHAPITRE III. — Action de la cystéine.

1. Action des acides aminés autres que la cystéine.
2. Action de la cystéine seule.
3. Action de la cystéine en présence de cystéine monobromacétique :
   a) Cystéine + ABr.
   b) Cystéine + ABr + alanine.
   c) Cystéine + ABr + eau de levure.
   d) pH.
4. Bilan de la fermentation en présence de cystéine et d'ABr.
5. Culture des levures en présence de cystéine et d'ABr.
6. Spécificité de l'action de la cystéine vis-à-vis d'autres corps sulfurés et d'autres corps halogénés :
   a) Dérivés de l'urée.
   b) Autres acides halogénés.
   c) Aldéhydes.

CHAPITRE IV. — Action des esters halogénés sur la cellule de levure.

1° Inhibition de la respiration et de la fermentation par les esters de l'acide monobromacétique.

2° Inhibition par les chloracétates.

3° Inhibition de la croissance par ces divers esters.

4° Absence d'action des complexes d'hexaméthylènetétramine.

5° Mélange d'ester et de cystéine.

CHAPITRE V. — Inhibition de la fermentation sans inhibition de la croissance.

1° Relation entre fermentation, respiration, réaction de Pasteur-Meyerhof, et croissance cellulaire.

2° Observation des levures par la méthode des colorations vitales.

3° Culture des levures en fioles d'Erlenmeyer. Irréversibilité de l'arrêt de la fermentation après culture sur ABr.

4° Culture des levures en courant d'air, en présence de ABr.

5° Cultures des levures sur lactate en présence de ABr.

6° Indépendance de la croissance et de la fermentation

Chapitre VI. — Combinaison entre la levure et les dérivés halogénés.

1° Fixation de l'acide bromacétique par la levure.

2° Dosage du brome dans la levure et dans les liquides de fermentation.

3° Bromacétate d'éthylglycol et levure.

Conclusion.

Bibliographie.

Index alphabétique des corps étudiés.

CHAPITRE I.

PROPRIETÉS CHIMIQUES DES CORPS ÉTUDIÉS.

A. — Propriétés des acides gras halogénés.

Le but de ce travail est de rechercher les rapports qu'il y a entre les propriétés physiques et chimiques d'un groupe de corps, et leurs propriétés physiologiques. L'expérience a montré que l'on peut effectivement, connaisssant l'aptitude des corps à réagir, prévoir au moins qualitativement, leur action physiologique. La cellule vivante est un milieu très complexe, encore très mal connu en tant que cellule vivante ; la vie même est une suite de réactions chimiques mettant en jeu des affinités déterminées. En faisant agir sur la cellule des corps dont les affinités nous soient bien connues, nous pouvons espérer arriver à nous faire une idée des affinités de la cellule vivante. Dans ces conditions, le réactif chimique doit être employé très attentivement. Il faut connaître à fond ses possibilités, et surtout ses aptitudes à réagir en milieu très étendu. Les données de cet ordre sont rares et dispersées dans les périodiques de chimie. C'est pourquoi j'ai cru indispensable de grouper en tête de ce mémoire de physiologie, les données chimiques connues sur la famille des corps dont j'étudierai plus loin l'action sur la cellule de levure.

1. Préparation des acides gras halogénés.

Les acides acétiques halogénés sont très anciennement connus ; l'acide monochloracétique a été découvert par Leblanc (en 1844) ; l'acide monobromacétique par Perkin et Duppa. (en 1858) ; ces deux derniers auteurs préparèrent l'acide iodacétique en 1859. Les propriétés physiologiques remarquables de ces deux derniers corps sont restées 70 ans ignorées.

L'acide acétique est un corps chimiquement très résistant,

notamment à l'oxydation. Pour introduire un halogène dans sa molécule, il faut une réaction très violente, l'action du phosphore et du brome sur l'acide organique. La réaction est la suivante : on transforme d'abord l'acide en bromure d'acide :

$$3\ RCH^2CO^2H + P + 5\ Br = 3\ RCH^2COBr + PO^3H + 2\ HBr$$

Le bromure d'acide ainsi formé réagit par substitution à l'hydrogène en α d'un atome de brome ; on obtient ainsi le bromure de l'acide α bromé correspondant :

$$RCH^2COBr + 2\ Br = RCHBrCOBr + HBr$$

Le bromure d'acide α bromé ainsi préparé se décompose instantanément pour donner l'acide α bromé correspondant qui lui est relativement très stable :

$$RCHBrCOBr + H^2O = RCHBrCO^2H + HBr$$

Les réactions de préparation des chlorures sont tout à fait analogues. La préparation d'acides iodés se fait facilement à partir de l'acide bromé ; comme nous le verrons le brome est très mobile dans cette molécule organique ; il est déplacé quantitativement par l'iode par une réaction de double décomposition, qui se produit à froid :

$$CH^2BrCO^2K + IK = KBr + CH^2ICO^2K.$$

Cette réaction qui se fait avec une extrême facilité nous donne une idée de l'extraordinaire aptitude à réagir des dérivés iodés et bromés.

Il est possible d'obtenir directement l'acide monobromacétique par exemple, en faisant réagir le brome sur l'acide acétique. Il faut chauffer à 150° en tubes scellés. On peut obtenir l'acide monochloracétique en faisant passer un courant de chlore dans de l'acide acétique étendu d'eau, et en plaçant le mélange au soleil. Les rendements de ces réactions d'halogénation directe sont assez faibles. L'acide acétique et les autres acides gras sont donc des corps chimiquement presque inertes.

On peut considérer l'acide acétique halogéné comme un ester de l'acide alcool correspondant :

$$RCH^2BrCO^2H + H^2O = RCHOHCO^2H + HBr.$$

L'estérification des acides alcool se fait beaucoup plus difficilement que l'estérification des alcools simples.

2. Solubilité.

Les acides organiques, bromés ou non, sont solubles dans l'eau, en toutes proportions, jusqu'aux corps en C^3. Ces acides sont également solubles dans les solvants des corps gras, mais la solubilité est cette fois limitée. Au point de vue physiologique, un facteur considéré avec beaucoup d'attention en pharmacologie est le coefficient de partage d'un corps entre l'eau et les solvants organiques. Ce coefficient de partage a été étudié en détail par H. W. Smith et White en 1929, pour les principaux acides gras et quelques uns de leurs dérivés halogénés. Le coefficient de partage a été mesuré pour le système eau/toluène, eau/benzène et eau/chloroforme. Les résultats sont du même ordre pour ces trois corps, encore que les coefficients de partage varient du simple au double, du toluène au chloroforme, le benzène se plaçant entre les deux. Le tableau I groupe toutes les données obtenues par les deux auteurs : les acides gras non substitués sont plus solubles dans l'eau que dans les carbures, sauf pour le cas des acides en C^6. Le coefficient de partage solvant/eau dans les carbures, ou les dérivés chlorés, croît rapidement d'ailleurs avec le poids moléculaire de l'acide considéré. Il croît également lorsqu'on introduit dans la molécule un halogène, et croît avec le poids moléculaire de cet halogène. La présence d'une double liaison diminue par contre notablement le coefficient de partage. L'halogène placé en α augmente davantage le coefficient de partage que l'halogène placé en β.

Nous verrons plus loin que l'activité physiologique des dérivés halogénés décroît de l'acide acétique à l'acide propionique et à l'acide valérianique : l'activité physiologique de ces corps est donc indépendante de leur solubilité dans les solvants des graisses. On est obligé de conclure ainsi, car dans le passage du dérivé chloré au dérivé bromé il y a une augmentation considérable du coefficient de partage qui est, cette fois, parallèle à l'augmentation de l'activité physiologique ; dans le passage du dérivé bromé au dérivé iodé, il y a encore augmentation considérable du coefficient de partage, alors qu'il n'y a aucune augmentation d'activité physiologique. L'acide phénylacétique, qui s'accumule davantage dans le benzène ou le chloroforme que dans l'eau, est un corps à peu près sans action physiologique.

TABLEAU I.

Coefficient de partage de divers acides organiques entre l'eau et divers solvants des graisses. (d'après HOMER W. SMITH et J. A. WHITE (1929).

Coefficients multipliés par 100.

Milieu		Acétique	Propionique	Butyrique	Valérianique	Caproïque
Eau et Toluène	Acide normal		4,6	15	63	345
	— iso			13,6	44,7	
	Substitution de Br en α	2,65	13,7	44,3	182	
	— Br en β		10,6			
	— I en β	6,04	23,5			
	— C^6E^5	74,5				
	— double liaison en α					
Eau et Benzène	Acide normal		6,0	22,4	81,4	427
	— iso			18,9	58,2	340
	Substitution de Cl en β		8,7			
	— Br en α	3,6	21,2	70,8	232	
	— Br en β		14,0			
	— I en β	8,3	31,9			
	— C^6H^5	100				
	— double liaison en α			12,2		
Eau et Chloroforme	Acide simple		16,0	53,1	218	1122
	— iso			55,8	155	790
	Substitution de Cl en β		13,6			
	— Br en α		31,8	97,2		
	— Br en β		24,4			
	— I en β	16	55			
	— C^6H^5	294				
	— double liaison en α			31,4		

On peut songer à extraire d'un milieu un acide halogéné, pour en faire le dosage ; le tableau I montre qu'il faut se servir de chloroforme pour opérer cette extraction. Le coefficient de partage étant bien inférieur à 1 pour les dérivés de l'acide acétique, il faudra laver le liquide à extraire avec une grande quantité de chloroforme pur pour pratiquer cette extraction.

3. Dissociation de la fonction acide.

On sait que les acides gras sont des acides faibles ; leur constante de dissociation va en diminuant de l'acide formique à l'acide acétique, diminue faiblement de l'acide acétique à l'acide propionique et, à partir de cet acide, ne varie pratiquement plus au fur et à mesure que s'allonge la chaîne carbonique. Si nous introduisons un halogène dans la molécule, à côté de la fonction acide, la fonction acide devient beaucoup plus forte ; la constante de dissociation est en chiffres ronds 100 fois plus élevée pour la substitution du chlore ; le brome a un effet légèrement plus faible mais dont l'ordre est le même que pour le chlore ; l'iode agit un peu moins que le brome. Si on introduit un oxhydrile à côté de la fonction acide, on augmente environ 10 fois la constante de dissociation. Si l'halogène ou l'oxhydrile sont introduits dans la molécule non pas à côté de la fonction acide, mais à l'autre bout de la molécule, la constante de dissociation de l'acide est très peu changée.

Le tableau II donne les valeurs absolues des constantes de dissociation des divers acides gras, et de leurs dérivés halogénés, ou possédant un oxhydrile ; ces constantes ont été empruntées aux tables de LANDOLT. Le tableau III donne l'inverse du logarithme de ces constantes de dissociation ; on trouve en effet dans la plupart des ouvrages à l'heure actuelle, les acides organiques caractérisés par cette constante ou pK ; cette constante a une signification simple : l'acidité réelle ou pH d'une solution à demi neutralisée de l'acide considéré, ou si l'on veut l'acidité réelle d'un mélange équimoléculaire de l'acide considéré et de son sel de sodium a pour valeur le pK inscrit dans le tableau. Tous ces acides organiques faiblement dissociés, ont un effet tampon considérable précisément pour les pH voisins du pK ; comme dans les milieux biologiques il y a toujours neutralisation partielle de ces acides par les ions minéraux toujours présents, nous pouvons déduire immédiatement de ce tableau si dans le milieu considéré nous avons à faire à l'acide ou au sel du corps considéré. En effet, deux cas peuvent se présenter :

1° Nous avons un gros excès de l'acide considéré. Dans ce cas, cet acide va imposer un pH de l'ordre de son pK.

2° Nous introduisons dans le milieu une faible quantité de l'acide considéré, de manière à ce que le pH varie peu. Dans ces conditions, si le pH est supérieur au pK, nous aurons affaire au sel de l'acide considéré ; si le pH du milieu est inférieur au pK de l'acide, nous aurons affaire à l'acide lui-même. C'est ainsi que dans le vin, d'une manière générale dans les solutions d'acide tartrique partiellement neutralisées dont le pH est voisin de 3, l'acide acétique et les autres acides organiques sont libres sous la forme d'acide ; leurs dérivés halogénés sont partiellement libres, partiellement sous leur forme de sel.

Dans le lait, dont le pH est compris entre 6 et 7, tous les acides considérés sont sous la forme de sels. Dans la bière dont le pH est voisin de 5, les acides halogénés en α sont sous forme de sels, mais les acides gras non halogénés ou halogénés à l'extrémité de leur chaîne sont partiellement sous forme acide, ou partiellement sous forme de sels.

TABLEAU II.

Constantes de dissociation des acides gras de leur dérivés halogénés et oxydrilés. Valeurs absolues multipliées par 10^5 (D'après LANDOLT BORNSTEIN).

	Formique	Acétique	Propionique	Butyrique	Valérianique
Acide organique.....	21,4	1,86	1,4	1,5	1,6
Cl en α.....		155	147	139	
Cl en ω.....			8,6	3	2
Br en α.....		138	108	106	
Br en ω.....			9,8	2,6	1,9
I en α.....		75			
I en ω.....			9		1,7
OH en α.....		(1) 15	(2) 13,8		
OH en ω.....			3	1,9	2

(1) Acide glycolique.
(2) Acide lactique.

TABLEAU III.

Inverse des logarithmes des constantes de dissociation des acides gras, de leurs dérivés halogénés et de leurs dérivés oxhydrilés.
pK.

	Formique	Acétique	Propionique	Butyrique	Valérianique
Acide organique.....	3,7	4,74	4,85	4,83	4,81
Cl en α.....		2,81	2,83	2,84	(2,9)
Cl en ω.....			4,6	4,5	4,7
Br en α.....		2,86	2,97	3,0	(3,0)
Br en ω.....			4,00	4,59	4,7
I en α.....		3,12			
I en ω.....			4,05	(4,7)	4,76
OH en α.....		(1) 3,82	(2) 3,85	(3,9)	(3,9)
OH en ω.....			4,51	4,72	4,7

(1) Acide glycolique.
(2) Acide lactique.

Les valeurs entre parenthèses sont extrapolées.

Toutes les autres constantes sont calculées d'après les tables de LANDOLT, édition 1923, Tableau 221 ; la température choisie est celle de 25°.

4. Hydrolyse de l'halogène.

Un acide halogéné placé dans l'eau s'hydrolyse suivant l'équation :

$$RCHXCO^2H + H^2O = RCHOHCO^2H + HX$$

Cette hydrolyse se fait avec une vitesse sensible à la température ordinaire, et rapidement à l'ébullition. Au point de vue théorique, la vitesse de cette hydrolyse est intéressante à connaître, car elle met en évidence une mobilité du brome et de l'iode dans l'acide bromacétique et iodacétique, dont la

table des constantes de dissociation ne donne pas l'idée. Au point de vue pratique, la vitesse de cette hydrolyse est également importante à connaître, car la décomposition de ces acides entraîne une altération importante des solutions de ces acides.

L'hydrolyse de ces acides halogénés a fait l'objet d'un grand nombre de recherches de chimie. Les principales recherches à ce sujet ont été faites par Lossen, entre 1897 et 1905, par Senter depuis 1907, et Drushel et Simpson 1917. Le tableau IV rassemble quelques données numériques déterminées par ces divers auteurs, recalculées pour la même température de 52°4. Ce tableau montre que les acides bromés réagissent au moins 20 fois plus rapidement que les acides chlorés correspondants. D'autre part, les constantes d'hydrolyse ont été données pour le cas où l'hydrolyse se fait en milieu acide dans l'eau, pour le cas où l'hydrolyse se fait à partir du sel neutre, c'est-à-dire encore en milieu acide puisque l'hydrolyse engendre un acide halogéné qui est un acide fort, enfin en présence d'un alcali capable de neutraliser l'acide au fur et à mesure qu'il se forme. Remarquons qu'aucune de ces conditions n'est correcte au point de vue de la chimie physique, puisqu'il y a une variation considérable d'acidité au fur et à mesure de l'hydrolyse. Il faudrait des hydrolyses faites en présence d'un gros excès de sel tampon, à pH constant, pour savoir exactement comment l'hydrolyse est influencée par l'alcalinité. De fait, les divers auteurs ont trouvé les constantes de réaction variables en fonction du temps, surtout pour le milieu alcalin, où l'alcali disparaît au fur et à mesure de la réaction. Dans ces conditions ; les chiffres qu'ils ont obtenus ont une valeur médiocre d'ordre de grandeur. Ils sont cependant intéressants à ce titre : l'hydrolyse se fait plus rapidement en milieu alcalin ou même en milieu neutre, qu'en milieu acide. La vitesse d'hydrolyse croît, d'autre part, lorsque croît le poids moléculaire de l'acide. Toutefois en milieu alcalin les acides de poids moléculaire élevés réagissent moins vite qu'en milieu acide ou voisin de la neutralité. De ce tableau on peut conclure que les dérivés bromés sont beaucoup plus actifs que les dérivés chlorés, ce qui, nous le verrons se confirmera au point de vue physiologique, mais que les dérivés de poids moléculaire élevé sont plus actifs que les acides acétiques halogénés, ce qui nous le verrons, est sans rapport avec les propriétés physiologiques de ces acides.

TABLEAU IV.

Hydrolyse des acides halogénés à 52° 4 (d'après SENTER, 1909, 1910, et d'après DRUSHEL et SIMPSON, 1917.

Les réactions sont effectuées dans des solutions décinormales ; les constantes sont données en prenant comme unité la molécule gramme par litre, et la minute. Les valeurs absolues sont multipliées par 10^5.

	Acétique	Propionique	Butyrique
Cl en α acide et eau			
sel neutre	5,5 (1)		
sel + NaOH	180 (2)		
acide + NO^3Ag			
Br en α acide et eau	85	170	220
sel neutre	100	1400	2600
sel + NaOH	6500	900	800
acide + NO^3Ag	6400	480000	1440000
I en α sel neutre	30 (1)		

(1) D'après DRUSHEL et SIMPSON, 1917. (Recalculé pour 52°).
(2) Recalculé d'après SENTER, 1910.
(3) Toutes les autres valeurs d'après SENTER, 1909.

L'hydrolyse à la température ordinaire a été suivie par LOSSEN et ses collaborateurs pour divers acides bromés. Ils ont trouvé que les acides monobromés s'hydrolysent d'eux-mêmes vingt fois plus vite environ que les acides monochlorés ; ils ont trouvé que les acides dibromés, comme les dérivés dichlorés, tribromés et trichlorés, sont beaucoup plus stables en milieu aqueux. J'ai déterminé sur les solutions normales et décinormales d'acide bromacétique, l'hydrolyse en fonction du temps, en dosant l'acidité libre, le brome et l'acide monobromacétique non transformé existant dans la liqueur. Le tableau V donne les chiffres observés, dans des solutions normales et décinormales. L'hydrolyse marche proportionnellement au temps et à la concentration en acide. Il faut environ 15 mois pour que la moitié de l'acide soit hydrolysé. Les solutions restaient à la température du laboratoire, qui varie de 16° en hiver à 30° en été. Ces hydrolyses va-

riant rapidement de vitesse en fonction de la température, il n'y a pas lieu de déterminer dans ces conditions de valeur précise de la constante de réaction.

TABLEAU V.

Hydrolyse de l'acide bromacétique en solution aqueuse à la température ordinaire.

Concentration en millimolécules par litre.

Date	Temps écoulé en jours	Acidité libre	Halogène libre	Acide halogéné
27/ 1/31	0	640	74	490
23/ 7/31.....	177	720	140	420
27/11/31.....	301	790	230	330
5/ 4/32.....	342	850	290	270
5/ 7/32.....	532	880	320	240
13/10/32.....	630	920	360	190
5/12/32	682	1.200	390	
24/ 1/33.....	721	1.100	390	170

Comparaison entre un acide normal et un acide décinormal.

Date	Temps écoulé en jours	Pourcentage de l'acide hydrolisé	
		Acide normal p. 100	Acide décinormal p. 100
2/10/31.....	0	1	2
28/11/31.....	56	4	6
17/12/31.....	75	7	8
5/ 7/32.....	273	10	14
10/10/32.....	369	41	41
25/11/32.....	413	44	43
24/ 1/33.....	472	49	48

5. Méthode de dosage des acides halogénés.

L'hydrolyse facile des acides halogénés en milieu alcalin et à l'ébullition, donne une méthode de dosage de ces corps au moins dans une solution dépourvue de matières organiques attaquables en milieu alcalin à l'ébullition. Il suffit d'ajouter à une solution d'acide halogéné de l'ordre de N/10

ou N/20, l'alcali nécessaire pour saturer non seulement l'acidité actuelle, mais encore celle qui prendra naissance au cours de l'hydrolyse, de faire bouillir une dizaine de minutes pour les acides bromés, 40 minutes environ pour les acides chlorés, pour mettre en liberté la totalité de l'halogène libre. L'halogène ainsi libéré se titre aisément après neutralisation à l'acide sulfurique, par le nitrate d'argent en prenant pour indicateur le chromate de potasse. Il est indispensable de faire un dosage à blanc, avant l'hydrolyse, mais après addition de l'alcali et neutralisation par l'acide, afin de tenir compte de l'halogène apporté par l'acide, hydrolysé antérieurement, ou par les réactifs.

Cette méthode ne permet pas de distinguer entre le chlore et le brome, il est possible de doser spécifiquement le brome en le libérant au moyen d'un oxydant, tel que le bichromate de potassium en milieu sulfurique, cela naturellement après hydrolyse ayant mis l'ion brome en liberté. Le brome libéré est recueilli dans une solution de fluorescéine, où il donne de l'éosine. Ce procédé dû à LABAT, est décrit en détail dans le Traité de Chimie analytique de DENIGÈS, CHELLE et LABAT.

6. Réaction de l'halogène vis-à-vis d'autres acides.

Les acides halogénés réagissent avec l'acide sulfureux et ses sels. L'acide sulfureux déplace l'halogène, et forme un acide organique sulfoné. La réaction se passe à la température ordinaire ; elle a été étudiée en détail par BACKER et MELS en 1930. Elle obéit à l'équation :

$$RCHXCO^2K + SO^3K^2 = RCH(SO^3K)CO^2K + KX$$

Les deux auteurs hollandais ont comparé soigneusement en solution décinormale la vitesse de cette réaction pour un grand nombre de dérivés chlorés, bromés et iodés. La tableau VI porte des constantes de réaction pour tous les corps étudiés. Nous retrouvons comme pour l'hydrolyse, une réaction beaucoup plus grande du brome par rapport au chlore ; mais cette fois l'iode réagit plus vite que le brome. D'autre part, au fur et à mesure que croît le poids moléculaire de l'acide considéré il y a une diminution considérable de la vitesse de la réaction qui peut tomber au 1/10000 de la vitesse avec l'acide bromacétique. Nous verrons que les propriétés physiologiqes de ces divers corps se classent dans un ordre analogue à l'ordre dans lequel se classent leur réactivité avec le bisulfite. Le parallélisme est grossier : des phénomènes d'ad-

sorption jouent dans la cellule vivante, les réactions sont en milieu hétérogène et non en milieu homogène, *à priori* il n'y a pas lieu de chercher un parallélisme quantitatif entre ces réactions chimiques en milieux aqueux, et les phénomènes biologiques. Mais nous verrons que l'on peut analyser précisément ces phénomènes d'adsorption qui séparent les réactions biologiques des réactions chimiques en milieu homogène.

TABLEAU VI.

Constantes des vitesses de réaction du sulfite sur les divers acides aliphatiques halogénés (d'après Backer et Mels (1930).

	Acétique	Propionique	Butyrique normal	Valérianique normal	Isovalérianique normal	Caproïque normal
Cl en α	46	1,6				
Cl en ω		5,3				
Br en α	4540	134	45	23	0,4	15
Br en ω		205				
I en α	7930	252				
I en ω		326				

Les constantes de réaction données par les auteurs ont été multipliées par 10^4.

Les acides halogénés réagissent sur l'hyposulfite de soude ; l'hyposulfite déplace le brome, même en milieu extrêmement étendu, suivant la réaction :

$$CH^2BrCO^2R + S^2O^3Na^2 = NaS^2O^3CH^2CO^2R + NaBr$$

Cette réaction a été étudiée récemment par divers auteurs, qui ont cherché à vérifier les lois de la chimie physique : V. K. La Mer (1929), A. N. Kappanna (1929). La réaction se poursuit avec une vitesse mesurable à la température de 25° en solution N/1000. Cette simple indication suffit pour mettre en évidence l'extraordinaire sensibilité de cet atome d'halogène, au moins vis-à-vis de certains acides contenant du soufre.

7. Combinaisons avec les dérivés azotés.

Les acides acétiques halogénés réagissent avec les amines ; avec la triméthylamine il y a formation de bétaine :

$$CH^2BrCO^2H + N(CH^3)^3 = (CH^3)^3(CH^2—CO^2H)NBr$$

Cette réaction est connue depuis fort longtemps ; la bétaïne se rencontre d'ailleurs fréquemment dans le règne végétal ; elle a été retirée pour la première fois des eaux mères de la cristallisation du sucre de betterave (*Beta vulgaris*) d'où le nom de bétaïne donné à ce corps. La réaction qui donne lieu à la bétaïne se fait à la température ordinaire.

Les acides halogénés réagissent d'une façon générale sur toutes les amines :

la monométhylamine donne du méthylglycocolle ou sarcosine,

la diméthylamine donne du diméthylglycolle.

Les acides halogénés ont donc la propriété de bloquer la fonction amine pour donner des composés extrêmement stables. Ce fait explique sans doute pourquoi une action un peu prolongée des acides halogénés sur la cellule vivante, même en milieu très étendu, donne lieu à des phénomènes irréversibles.

Les acides halogénés, et leurs sels, peuvent de même former des complexes avec des bases organiques telles que la pyridine. Ces complexes ont été étudiés par Hans Tracher Clarcke en 1910. Le complexe se forme avec une vitesse mesurable à la température ordinaire. Les bromures d'alcool, en particulier les bromures d'allyle, de propyle et de benzyle, donne également un complexe avec la pyridine. Or, il se trouve que le complexe du bromure d'allyle et du bromure de benzyle se forment plus rapidement que le complexe d'acide bromacétique et des bromacétates organiques. Nous verrons plus loin que les bromures n'ont aucune action physiologique notable. La formation de ces complexes de pyridine n'a par conséquent aucun rapport avec les propriétés physiologiques de ces corps.

B. — Propriétés des esters d'acides gras halogénés.

1. Propriétés physiques.

Le tableau VII donne les points d'ébullition et les densités des chloracétates et bromacétates qui sont connus, ou que nous avons eus entre les mains : les constantes de densité des dérivés du glycol, de l'éthylglycol, du glycérol, de l'alcool benzylique et de l'alcool phénéthylique, sont les constantes observées sur les produits que nous a fournis la Maison Organico.

TABLEAU VII.

Propriétés physiques des acétates halogénés organiques.

Nombre d'atomes de carbone du Radical R	Corps étudiés Radical R	Chloracétates		Bromacétates	
		ébullition	densité	ébullition	densité
0	H.....	189	1,58	196	1,933
1	méthyle.....	130	1,22	144	
2	éthyle	144	1,1582	168,7	1,5059
3	propyle.....	162,3	1,1096	178	1,4166
«	isopropyle	149	1,0944	165,5	1,3989
4	butyle	175	1,081	78 (10^{mm})	
«	isobutyle	170	1,0675	188	1,3327
5	amyle				
«	isoamyle.....	190	1,063	207	
8	octyle			137 (18^{mm})	1,080
2	glycol *di*.....		1,394		1,512
4	éthylglycol.....		1,150		1,221
3	glycérol *tri*	205-208 (10^{mm})		218	1,589
7	benzyle.....		1,210		1,302
8	phénéthyle.....		1,117		1,257
3	allyle	164		73 (10^{mm})	

D'une manière générale, les dérivés bromés sont beaucoup plus denses que les dérivés chlorés, la différence étant naturellement d'autant plus grande que la molécule est plus riche en brome proportionnellement à sa masse. Les points d'ébullition des bromacétates sont très régulièrement de 16° environ plus élevés que ceux des chloracétates. Les points

d'ébullition s'élèvent naturellement au fur et à mesure que croît le poids moléculaire de l'alcool. Une propriété très importante pour les applications pratiques, sur laquelle nous n'avons malheureusement pas de données précises, est la tension de vapeur à la température ordinaire. Les dérivés inférieurs, de l'alcool méthylique aux alcools butyliques, ont une tension de vapeur telle qu'ils sont désagréablement lacrymogènes. Le bromacétate de benzyle possède encore très légèrement cette action lacrymogène, qui est sensible sans être désagréable ; tout effet disparaît avec les acétates halogénés de polyalcools ou des alcools phénéthylique et octylique.

Le chloracétate de phénéthyle possède une odeur de jacinthe assez agréable, et a paraît-il été employé en parfumerie.

TABLEAU VIII.

Solubilité des divers bromacétates organiques dans les divers solvants.

Alcool estérifiant l'acide	Alcools		Ether	Carbures		Solvants chlorés		Terpène
	méthylique	éthylique		benzène	pétrole	tétra	chloroforme	
Abr Octyle.....	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzyle.....	+	+	+	+	+	+	+	+
Phénéthyle...	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycol.....	+	+	+	+	—	+	+	—
Ethylglycol..	+	+	+	+	—	+	+	+
Glycérol.....	+	+	+	+	—	—	+	—
ACl Benzyle.....	+	+	+	+	+	+	+	+
Phénéthyle...	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycol.....	+	+	+	+	—	+	+	—
Ethylglycol..	+	+	+	+	—	+	+	+

Les solubilités de tous ces corps dans l'eau sont très faibles. Dans la pratique, il faut passer par l'intermédiaire d'une solution alcoolique, normale ou N/2 des esters ; dans ces conditions on peut introduire tous ces esters dans l'eau en

solution N/1000. Les acétates de glycol ont une solubilité de l'ordre du gramme par litre, c'est-à-dire de N/200. Le bromacétate d'éthylglycol, en solution, dans 10 fois son volume d'alcool (ce qui représente à peu près six fois son poids) est même miscible à l'eau en toutes proportions. Ce corps est le seul rencontré qui possède cette propriété.

Les bromacétates sont par contre solubles en toutes proportions, dans la plupart des solvants organiques : alcools benzène, toluène, éther. Parmi les solvants chlorés : chloroforme et trichloréthylène, dissolvent tous les esters ; le tétrachlorure de carbone dissout mal le bromacétate de glycérol. L'éther de pétrole dissout les bromacétates d'alcools simples : octylique, benzylique, phénéthylique ; il dissout mal ceux de glycol, éthylglycol et glycérol. Enfin les terpènes dissolvent tous les acétates halogénés sauf ceux de glycol et de glycérol ; les dérivés d'éthylglycol sont miscibles en toutes proportions. Le tableau VIII résume ces propriétés de solubilité.

Nous ne possédons malheureusement pas de données numériques sur la solubilité dans l'eau des divers bromacétates. Par contre, nous avons des données précises sur la solubilité dans l'eau des divers esters d'acides gras. le Tableau IX résume, d'après les données de TRAUBE, la solubilité des esters des principaux acides gras dans l'eau à 22°, en g. p. 100 de solvant. Cette solubilité diminue rapidement lorsque croît le poids moléculaire, que ce soit le poids moléculaire de l'acide ou le poids moléculaire de l'alcool. Il est visible, d'après le tableau que la solubilité de l'acétate d'amyle doit être de l'ordre de 1 à 2 g. par litre.

TABLEAU IX.

Solubilité dans l'eau des divers esters d'acides gras.
LANDOLT, t. I, 1, p. 752, à 22°, d'après TRAUBE.

Acide	Formique	Acétique	Propionique	Butyrique n
CH^3OH.....		25	5	1,7
C^2H^5OH.....	10	8,3	1,7	0,5
C^3H^7OH.....	2,1	1,7		
Iso C^4H^9OH...	1,0	0,5		
Iso $C^5H^{11}OH$..	0,3			

2. Saponification et hydrolyse.

La séparation de l'acide halogéné et de l'alcool se fait avec une grande facilité. Il suffit d'introduire une petite quantité de ces esters dans une solution N/10 de soude pour observer immédiatement la dissolution avec dégagement de chaleur. Dans le cas des dérivés d'octyle, l'alcool se sépare de l'eau. Dans les conditions où se fait cette première saponification, il n'y a pas séparation de l'halogène. Il est ainsi facile de doser, dans un produit commercial, la quantité d'acide combiné sous forme d'ester hydrolysable à froid en solution étendue, ce qui correspond à l'acide estérifié à l'alcool, et d'autre part, il est facile de doser à chaud l'halogène combiné, qui est infiniment plus robuste.

En l'absence d'alcali, en solution étendue aqueuse même légèrement acide, il y a également l'hydrolyse de l'ester. Cette hydrolyse semble d'autant plus facile que l'alcool correspondant est plus soluble dans l'eau. C'est là une limite, dans la pratique assez importante, à l'emploi de ces corps.

Les tables des constantes nous renseignent sur les vitesses d'hydrolyse des esters éthyliques en solution de HCl N/20.

TABLEAU X.

Vitesse d'hydrolyse des esters éthyliques en solution HCl N/20. LANDOLT, 1395 à 1396, II, 2. Température 25°.

	Formiates	Acetates	Propionates	Butyrates n	Valérianates n
Acide.....	1920	66	72	40	15
Cl en α.....			28		
Cl en β.....		46	10		
Br en α.....			21		
Br en β.....			8		
OH en α.....		70	72	40	
OH en β.....			16	11	

Le tableau X montre que cette vitesse d'hydrolyse est peu plus faible pour le chloracétate que pour l'acétate ; elle est

beaucoup plus faible pour les bromopropionates que pour les propionates. On peut en déduire que l'hydrolyse des bromacétates doit se faire au moins deux fois plus lentement que l'hydrolyse des acétates.

TABLEAU XI.

Vitesse d'hydrolyse des acétates des divers alcools en milieu acide HCl N/20. LANDOLT, idem.

Acétates	Température	
	25°	35°
CH^3	65	166,1
C^2H^5	66	161
Glycol	47,1	117
Méthylglycol	45	122
Ethylglycol	44	118
CH^2CH^2Cl	47	118
CH^2CH^2Br	56	139
Allyle	65	165

Le tableau XI donne les vitesses relatives d'hydrolyse des acétates des divers alcools, toujours en milieu HCl N/20 : un fait extrêmement remarquable apparaît : la vitesse d'hydrolyse en milieu acide est indépendante de la nature de l'alcool ; qu'il s'agisse d'un alcool gras simple, d'un dialcool, d'un alcool éther, d'un alcool halogéné, ou d'un alcool éthylénique, la vitesse est sensiblement la même.

Il en est tout autrement en milieu alcalin : la vitesse relative de saponification décroît très rapidement lorsque croît le poids moléculaire de l'alcool, (tableau XII) ; elle décroît rapidement lorsqu'on passe d'un ester d'alcool primaire à un d'alcool secondaire, et décroît encore lorsqu'on passe à l'alcool tertiaire correspondant. Par contre les esters d'alcools éthyléniques, les alcools cycliques, les polyalcools et les alcools-éthers, s'hydrolysent beaucoup plus rapidement que les esters d'alcools gras simples. Ce dernier point nous expliquera l'action fugace observée avec les bromacétates de glycol et d'éthylglycol.

TABLEAU XII.

Vitesse relative de saponification en milieu alcalin des acétates à 20°. LANDOLT BORNSTEIN, II, 2, 1927.

	Nature des alcools				
	Primaire	Iso	Secondaire	Tertiaire	Ethylénique
CH^3	155				
C^2	100				9600
C^3	83	25			179
C^4	77	70		16	113
C^5		71	7	0,73	
C^6H^5	1250				
$C^6H^5CH^2$	195				
$C^6H^5CH^2CH^2$			66		

	Ol	Méthoxy	Ethoxy	Propoxy
diol C_1		577	486	412
diol C_2	266	230	216	215
diol C_3	155	130	124	
triol	316			

3. Propriétés de l'halogène.

L'halogène des bromacétates organiques réagit chimiquement de même façon que l'halogène de l'acide bromacétique : Il est déplacé par le bisulfite ou l'hyposulfite (BACKER et VAN MELS, 1930, SLATOR, 1905). Il est très important de remarquer que dans ces deux cas, les constantes de réaction sont beaucoup plus élevées pour les bromacétates organiques que pour les bromacétates minéraux. Le tableau XIII montre un certain parallélisme entre les chiffres trouvés par l'auteur anglais en 1905, et ceux trouvés par les auteurs hollandais, en 1930. Dans les deux cas, les corps se placent dans le même ordre.

TABLEAU XIII.

Réaction des bromacétates organiques sur les acides dérivés du soufre.

Dans le cas de l'hyposulfite, d'après A. Slater 1905, dans le cas du bisulfite, d'après Baker et Van Mels 1930.

Corps combinés à l'acide	Chloracétate		Bromacétate		Iodacétate	
	S^2O^3	SO^3	S^2O^3	SO^3	S^2O^3	SO^3
Na	40	7	300	700		1220
CH^3	58		5800			
C^2H^5	60	130	6400	18300	7000	24000

Les chiffres indiqués sur ce tableau sont les constantes de réaction données par les auteurs pour la température de 25°, et une dilution inférieure à N/10 ; les chiffres donnés par les auteurs ont été uniformément multipliés par 1000. Dans le cas des bisulfites la réaction se faisait dans l'alcool à 40 p. 100.

4. **Combinaisons avec les substances azotées.**

Les bromacétates organiques sont couramment employés en chimie organique pour les synthèses. Ils donnent, avec une extrême facilité, deux sortes de dérivés : des dérivés d'addition, où le brome reste fixé dans la molécule, des dérivés de substitution, où le carbone du groupement CH^2Br se fixe à un atome d'azote, tandis que le brome est éliminé sous forme d'un bromure.

Les réactions du premier type sont donnés par exemple par l'hexaméthylènetétramine et la pyridine.

Locquin en 1900 a décrit quelques uns des complexes d'hexaméthylénetétramine et des bromacétates organiques. La réaction est la suivante :

$$CH^2BrCO^2C^2H^5 + C^6H^{12}N^4 = C^6H^{12}N^4CH^2BrCO^2C^2H^5.$$

Cette réaction se fait à la température ordinaire, dans le chloroforme. Les complexes d'hexaméthylènetétramine obte-

nus sont des corps cristallisés blancs, solubles dans l'eau. J'en ai préparé quelques-uns à partir des bromacétates non encore décrits. Malheureusement au point de vue physiologique ils sont inactifs, le brome étant bloqué.

H. Th. Clarcke a décrit les complexes de pyridine et de bromacétates organiques. Ces complexes se forment à la température ordinaire, en solution benzénique ou alcoolique. (Dexter, Mc Combie, Scarboroney). La vitesse de formation croît d'ailleurs lorsque le mélange est plus riche en eau. Ces complexes se forment plus lentement, que ceux d'hexaméthylène-tétramine. La réaction qui leur donne naissance est la suivante :

$$C^5H^5N + CH^2BrCO^2R = C^5H^5NCH^2BrCO^2R.$$

Les réactions du second type sont données par les amines, quel que soit leur poids moléculaire. Par exemple, Braun Bayer et Cassel ont utilisé récemment la réaction de la phényle phénéthyle éthylamine sur le bromacétate d'éthyle. La réaction se fait en solution benzénique à la température ordinaire. Il y a dans cette réaction élimination du brome de la molécule, sous forme de bromure d'amine :

$$2\,C^6H^5CH^2(C^6H^5)CHCH^2NH^2 + CH^2BrCO^2C^2H^5 =$$
$$HBrC^6H^5CH^2(C^6H^5)CHCH^2NH^2 + C^6H^5CH^2(C^6H^5)CHCH^2NHCH^2CO^2C^2H^5.$$

Cette réaction est tout à fait générale ; H. P. Clarcke en 1913, a étudié la vitesse de cette réaction pour un très grand nombre d'amines en solution dans l'alcool : la réaction était si rapide qu'il fallait l'étudier à 0°. La constante de vitesse de la réaction est sensiblement la même quelle que soit l'amine considérée : aux erreurs d'expériences près elle est la même de la diméthylbutylamine à la diméthyloctylamine ; les dérivés iso ont également la même vitesse ; les diamines ont des vitesses simplement doubles ; l'introduction dans la molécule d'amine d'une fonction étheroxyde ne change pas la vitesse de réaction.

Les bases cycliques comme l'acridine et la quinoléine donnent des réactions semblables : formation d'un dérivé condensé avec élimination d'acide bromhydrique ; Cleno, W. H. Perkin et Robinson ont décrit ainsi, en 1924, la condensation de l'aminoacridine avec le bromacétate de métyle.

Cette dernière réaction est particulièrement intéressante parce qu'elle montre l'action spécifique du bromacétate

d'éthyle sur la fonction amine en présence d'une autre fonction azotée, celle de l'acridine. Voici la réaction :

$$C^6H^4CONHC^6H^3NH^2 + CH^2BrCO^2C^2H^5 = C^6H^4CONHC^6H^3NHCH^2CO^2C^2H^5 + HBr.$$

Les réactions de ce type ont été employées plusieurs fois par Cleno Perkin et Robinson dans leurs recherches sur la synthèse de la strychnine et de la brucine : tous les dérivés de l'aminoacridine, réagissent toujours spécifiquement sur ce groupement NH^2 ; toutefois, il y a assez facilement condensation dans le produit ainsi formé entre le carbone de l'acide incorporé à la molécule et l'aozte du noyau acridine.

La réaction des bromacétates sur les amines organiques a un double intérêt :

1° Elle permet de comprendre, ou du moins donne une hypothèse, sur le mécanisme de l'action des bromacétates sur les cellules vivantes.

2° Elle permet de comprendre que si on ajoute à un milieu sucré, à la fois un dérivé halogéné de l'acide acétique, et un excès d'une amine organique, l'inhibition de la fermentation disparaît. Cette expérience a été faite par Neuberg et Kobel et Zuckerkandl, Messiner et Klebermass en 1931.

CHAPITRE II.

INHIBITION DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE PAR LES ACIDES HALOGÉNÉS.

A. — Historique de la question.

La première mention d'une action des acides halogénés sur la fermentation alcoolique, se trouve dans une note de Rosenblatt et Rozenband, aux Compte-rendus de 1909 : ces auteurs recherchant l'action paralysante sur la fermentation, d'une série d'acides organiques, trouvent les chiffres suivants :

Acide acétique	N/2
Acide monochloracétique	N/50
Acide dichloracétique	N/100
Acide trichloracétique	N/25
Benzoique ou salicylique	N/60

Les auteurs ont étudié les acides et non leurs sels. Malgré que leur tableau montre déjà une influence nette de l'halogène sur l'action de l'acide acétique, ils n'en ont tiré aucune conclusion.

Le premier travail sur l'action physiologique de l'acide bromacétique est celui résumé dans les notes de Schwartz et Oschmann, en 1924 et en 1925 : ils ont prouvé que la contracture du muscle de Grenouille par l'acide monobromacétique, n'était accompagnée d'aucune formation d'acide lactique.

La contracture par l'acide monobromacétique avait été déjà signalée par Pohl en 1888. Schwartz et Oschmann n'ont pas cherché à généraliser cette action paralysante de l'acide bromacétique sur la formation d'acide l'actique dans le muscle, à la fermentation lactique des divers tissus animaux, que Warburg venait de faire connaître l'année précédente, encore moins à la fermentation lactique bactérienne ou à la fermentation alcoolique des Champignons. Par contre, ils ont déjà signalé que le bromacétate d'éthyle avait la même action que l'acide bromacétique.

Sans connaître les travaux des auteurs précédents, Einar Lundsgaard a trouvé en 1930 l'action spécifique en solution très étendue (N/2000) de l'acide monoiodacétique. L'analogie entre la fermentation lactique du muscle et la fermentation alcoolique des cellules de levure lui ayant été rendue familière par les travaux que Meyerhof publiait depuis 1918, il fit immédiatement cette généralisation d'un arrêt spécifique de la fermentation dans les deux cas.

Un grand nombre d'auteurs ont repris l'étude de l'action des acides acétiques halogénés sur les tissus animaux. L'historique de cette question sera donné dans un travail en cours d'exécution par J. Brisou.

E. Lundsgaard est revenu en 1932 sur l'action des acides halogénés sur la levure : il trouve que si l'acide bromacétique a la même action que l'acide iodacétique, les acides chloracétiques, bromopropionique et ses homologues plus élevés, sont beaucoup moins actifs. Il trouve d'autre part que l'action de l'acide iodacétique décroît lorsque le pH de la solution croît notamment du pH 6 au pH 7. Il a étudié en détail les phénomènes qui se passent lorsque la fermentation est arrêtée.

Au laboratoire du Professeur Neuberg, plusieurs auteurs ont étudié cette action inhibitrice :

Yamasaki, 1930, a montré que si dans le suc de levure, la fermentation des sucres était complètement arrêtée par l'acide iodacétique, la fermentation des hexosephosphates ne l'était point. En présence d'acide iodacétique en quantité juste suffisante pour inhiber la fermentation des sucres, il subsiste en effet, une certaine fermentation en présence des hexosephosphates ; mais la vitesse de cette fermentation est un peu plus faible que s'il n'y avait pas l'acide halogéné : il y a inhibition partielle de la fermentation des hexosephosphates.

Simon, en 1932, a repris l'étude d'une série de composés halogénés, comparés à l'acide monoiodacétique : l'aldéhyde correspondant, CH^2ICHO, la bromacétone $CH^2BrCOCH^3$, inhibent aux mêmes concentrations, alors que les alcools correspondants, ou les esters halogénés d'alcools sont inactifs.

Dès 1930, j'ai répété les expériences de Lundsgaard avec l'acide bromacétique ; j'ai pu confirmer entièrement le fait d'une inhibition spécifique de la fermentation alcoolique ; en 1931, L. Genevois et P. Cayrol ont publié une expérience qui complétait celle de Lundsgaard : en présence d'une quantité d'acide halogéné suffisante pour arrêter toute fermenta-

tion alcoolique, les levures typiques peuvent encore se développer aux dépens de la seule respiration ; la croissance est légèrement plus faible mais du même ordre que dans les récipients témoins ; la levure se multiplie de 20 à 40 fois. La levure qui s'est ainsi multipliée dans l'impossibilité de faire fermenter le sucre, a perdu tout pouvoir de le faire fermenter, même après plusieurs lavages. On peut, dans ces conditions, faire croître de la levure sur lactate, ce qui prouve que la réaction de PASTEUR-MEYERHOF n'est pas arrêtée par l'inhibition de la fermentation alcoolique.

La même année 1931, j'ai fait connaître que les acides propioniques et les acides supérieurs, ainsi que les acides chlorés, sont beaucoup moins actifs que les acides bromacétiques et iodacétiques. Divers uréides bromés, connus comme hypnotiques, se sont révélés comme inactifs sur la fermentation alcoolique même en milieu saturé.

En 1932 enfin, j'ai fait connaître que la cystéine renforce considérablement l'action de l'acide bromacétique ; l'inhibition peut alors avoir lieu dans une solution N/20000 de ce corps.

B. — INHIBITION DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE PAR L'ACIDE BROMACÉTIQUE.

1. Concentration en acide bromacétique.

Nous avons deux moyens pratiques de mesurer la fermentation alcoolique, et d'étudier l'inhibition par une substance donnée.

La première méthode est la méthode manométrique de WARBURG, déjà décrite dans « Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs ». Elle possède deux avantages fondamentaux : elle est quantitative ; les cellules sont dans un milieu homogène, constamment agité, en équilibre constant avec l'atmosphère gazeuse.

La seconde méthode plus ancienne, plus rapide, mais beaucoup moins correcte, ne donnant que des indications qualitatives, est la méthode des tubes de EINHORN : tubes que l'on remplit d'une suspension de levure dans une solution sucrée. En dehors de l'absence de mesure précise du gaz carbonique dégagé, de l'imprécision de la température d'expérience, cette

méthode présente encore d'autres inconvénients : si la levure fermente, elle reste en suspension dans le milieu et celui-ci peut être considéré comme approximativement homogène. Si la levure est inhibée dans sa fermentation, au moins pour une grande part, elle tombe au bas du récipient, s'y accumule et y crée des conditions de milieu et de concentration tout à fait différentes de l'ensemble du système. Dans ces conditions, les concentrations limites arrêtant la fermentation dans les tubes de EINHORN sont sensiblement plus élevées que celles observvées dans les récipients manométriques ; elles ne sont pas toujours mêmes d'une expérience à l'autre. La méthode manque de fidélité, ce qui est le plus grave de ses inconvénients. Néanmoins, toutes les fois qu'il suffit de fixer un ordre de grandeur, cette méthode se recommande par la rapidité de son exécution.

TABLEAU XIV.

Inhibition en fonction de la concentration en ABr.
Mesure faite manométriquement à 27°.

I_{O^2} = intensité respiratoire mm^3CO^2 par mg. sec et heure.

$F^{O^2}_{CO^2}$ = intensité de fermentation aérobie mm^3CO^2 par mg. sec et heure.

$F^{O^2}_{CO^2}$ = intensité de fermentation anaérobie mm^3CO^2 par mg. sans O^2.

Dates	Concentration en ABr	I_{O^2}	$F^{O^2}_{CO^2}$	$F^{CO^2}_{CO^2}$
		Levure haute typique.		
27-4-31	0	28	207	216
	$1,10^{-4}$	35	180	195
	$2,10^{-4}$	27	13	15
	$4,10^{-4}$	22	0	0
		Levure de vin blanc.		
7-5-31	0	57		177
	$1,10^{-4}$	62		52
	$2,10^{-4}$	56		0
	$4,10^{-4}$	50		0
		Levure de boulanger (Springer).		
14-1-31	0	54	48	209
	$0,5\ 10^{-4}$	54	29	72
	$1\ 10^{-4}$	60	13	42
	$2\ 10^{-4}$	64	7	2

L'acide bromacétique agit spécifiquement sur la fermentation alcoolique à des concentrations comprises entre la concentration 10^{-4} N et 10^{-3} N.

Pour une concentration de 4.10^{-4} en acide bromacétique (que nous désignerons désormais sous l'abréviation ABr), l'inhibition apparaît pratiquement d'une façon instantanée, c'est-à-dire qu'elle est complète 1/4 d'heure après le mélange de solutions. Pour une concentration plus faible, 2.10^{-4} par exemple, l'inhibition est une fonction du temps : pendant la première heure qui suit le mélange, l'intensité de fermentation décroît pour tomber à peu près à la dixième partie de sa valeur première.

Le tableau XIV donne les intensités de fermentation et de respiration pour deux levures typiques, en fonction de la concentration ; ces intensités sont mesurées selon l'usage en mm^3 de gaz dégagé par mg. sec et heure.

2. Concentration en levure.

Si l'on veut chercher à interpréter le mécanisme de l'action de l'acide bromacétique, il importe de savoir si à une concentration donnée en ABr, la fermentation varie en fonction de la concentration en levure. Si l'acide bromacétique se trouve combiné, par des forces quelconques à la levure, l'inhibition doit varier avec la concentration en levure, en admettant que la proportion d'acide combiné soit importante par rapport à la proportion d'acide existant en solution. L'expérience montre que pour des concentrations en levure de 0 mg.,18 (poids frais) par cm^3 à 6 mg. par cm^3, l'inhibition était à peu près la même aux erreurs d'expérience près. Le tableau XV, porte trois expériences faites à ce sujet, toujours par la méthode manométrique. Dans les trois cas la levure était de la levure de boulanger (levure Springer). La concentration en acide bromacétique était de N/5000, concentration qui permettait une inhibition d'environ 50 p. 100 de la fermentation. Il ne semble donc pas y avoir, dans ces conditions expérimentales, de combinaison que l'on puisse mettre en évidence d'une façon quantitative par ce procédé. Remarquons qu'aux concentrations les plus élevées, nous avons environ par litre de solution, 2 g. sec de levure et 28 mg. d'acide bromacétique. Cette quantité est relativement énorme par rapport aux quantités de ferments existant dans la levure.

TABLEAU XV.

Inhibition de la fermentation alcoolique anaérobie en fonction de la concentration en levure (levure de boulanger, Springer).

Milieu de PO^4KH^2 N/10 et saccharose 10 p. 100. T = 27°
Concentration en ABr : N/5000.

$F \frac{CO^2}{CO^2}$

Concentration en levure	Témoin	ABr	Témoin	ABr	Témoin	ABr
6 mg. p. cm^3.....	250	120	283	182	197	108
3 mg. —	260	114	280	185	197	121
1,5 mg. —	258	138	275	198	190	84
0,75 mg. —	266	135	263	139	180	92
0,37 mg. —	263	131				
0,18 mg. —	248	118				

3. Concentration en sucre.

Le rôle de la concentration en sucre est également important à considérer. La fermentation alcoolique varie très peu avec la concentration en sucre, lorsque celle-ci est supérieure à une certaine quantité, qui est de l'ordre de 1 p. 100. A 1 p. 1000, la fermentation est déjà très ralentie, surtout en milieu minéral. Meyerhof et Ken Iwasaki ont publié en 1931, quelques courbes à ce sujet. J'ai étudié les concentrations élevées en glucose, entre 2 et 20 p. 100, en solution phosphatée (PO^4KH^2 N/10) sans trouver une influence quelconque de la quantité de glucose. Le tableau XVI rapporte les chiffres d'une expérience où la levure s'était montrée assez sensible à l'action de l'ABr.

Il ne semble donc pas qu'il y ait une influence notable du sucre, même de glucose, sur l'inhibition ; ABr n'agit donc pas sur le sucre, pas même sur une forme active du sucre. Ce résultat semble assez vraisemblable, car on ne connaît aucune combinaison se faisant à froid en milieu étendu entre ABr, et un sucre ou une aldéhyde.

TABLEAU XVI.

Inhibition de la fermentation alcoolique anaérobie en fonction de la concentration en glucose.

Solution de saccharose phosphatée N/4000 en ABr.

$F \frac{CO^2}{CO^2}$ en fonction du temps.

Concentration en glucose	Concentration en ABr.	1re 1/2 heure	2me 1/2 heure
2 p. 100	0	196	217
20 —	0	229	252
2 —	N/4000	65	0
10 —	0	67	0
20 —	0	70	0

4. **Rôle du pH.**

Le rôle de l'acidité du milieu sur l'inhibition de la fermentation par l'acide bromacétique est considérable. Il a été étudié en détail par Einar LUNDSGAARD en 1932 : à la concentration N/2000 l'acide halogéné (des expériences ont été faites avec l'acide iodacétique qui se comporte comme l'acide bromacétique) l'inhibition est complète jusqu'à pH 5 et devient nulle à pH 7. Présenté sous cette forme, le rôle de l'acidité est évidemment frappant LUNDSGAARD n'a pas cherché les concentrations inhibitrices en fonction de l'acidité du milieu. Les expériences que j'ai faites confirment celles de LUNDSGAARD ; toutefois, si l'on augmente la concentration en acide bromacétique en milieu neutre, on arrive à une inhibition complète pour une concentration qui n'est pas très élevée, de l'ordre N/1000. Le rôle du pH est donc indéniable, mais cependant du second ordre par rapport à l'extraordinaire activité physiologique des acides bromacétique et iodacétique. Le tableau XVII reproduit une expérience faite selon le schéma de LUNDSGAARD, c'est-à-dire à concentration constante en acide bromacétique, N/4000. L'inhibition devient pratiquement nulle à partir de pH 6.

On pourrait imaginer qu'il s'agit dans ce phénomène de la neutralisation de l'acide bromacétique : l'acide CH^2BrCO^2H

serait actif, le sel CH^2BrCO^2Na serait inactif. Il n'en est rien ; en effet, l'acide bromacétique est un acide relativement fort (voir page 1011) ; son pK est de 2,8 : à ce pH, on trouve dans le milieu sensiblement autant de molécules acides que de molécules de sel. Nous pouvons en déduire qu'à pH 4, l'acide bromacétique est entièrement sous forme de bromacétate, très peu dissocié. Or, à pH 4 l'inhibition est encore maxima ; l'inhibition ne commence à décroître qu'à partir de pH 5 ; il ne peut donc s'agir du passage de l'acide au sel. D'autre part, l'étude physiologique de ce corps montre que son activité est liée au groupement CH^2BrCO^2R, R étant quelconque, ou du moins un alcool de poids moléculaire ou de constitution quelconque. Il n'y a donc aucune raison pour qu'un sel quelconque de l'acide bromacétique ne soit pas aussi actif que l'acide.

La diminution brusque d'activité de l'acide bromacétique entre pH 5 et 6 fait songer au changement de signe de la plupart des protéines, qui s'opère aux environs de pH 5 ; la diminution d'activité se trouverait due dans ces conditions, non pas à l'état de la molécule d'acide, mais à l'état de la cellule vivante elle-même. Cette hypothèse n'est, toutefois, pas sans objections assez graves.

En premier lieu, l'état physico-chimique de l'intérieur de la cellule, n'est pas en équilibre d'une façon simple avec le milieu extérieur. On n'a jamais pu démontrer que le pH de l'intérieur de la cellule soit égal au pH extérieur ; tous les travaux faits à ce sujet montrent au contraire un déséquilibre constant entre l'intérieur de la cellule et le milieu extérieur : Reiss (1929) trouve l'intérieur de la cellule, dans le cas des cellules de Vertébrés, plus acide que le milieu sanguin. Il en serait de même pour l'intérieur des cellules d'Algues. Le cas des cellules de levure est particulièrement difficile à étudier au point de vue expérimental, car ces cellules sont très petites, et relativement très pauvres en eau, puisqu'elles contiennent 30 p. 100 de matière sèche.

En second lieu l'étude de la cellule, au point de vue des échanges d'ions, faite dans ce laboratoire par P. Genaud, en 1929, n'a pu mettre en évidence au point de vue ionique, aucun phénomène qui puisse s'interpréter comme trahissant des substances protéiques présentant un poids isoélectrique au voisinage de pH 5. Au contraire, à tous les pH compris entre 4 et 8, la cellule de levure fixe ou échange des ions positifs ;

à aucun moment, même à pH 2, elle ne fixe des ions négatifs.

Reste à admettre une affinité de groupements aminés qui serait trop faible pour fixer des ions, mais qui serait suffisante pour fixer surtout en milieu acide, un groupement halogéné en α à côté d'un groupement carbonyle ; Cette hypothèse est vraisemblable, d'accord avec les faits, mais pour l'instant encore très arbitraire ; elle restera arbitraire jusqu'à ce que nous sachions doser ou mettre en évidence par un autre phénomène, ces groupements aminés hypothétiques.

TABLEAU XVII.

Inhibition de la fermentation en fonction du pH. Levure de Boulanger (Springer) ; 1 mg. sec par cm³. Les pH ont été réalisés par des mélanges d'acide citrique et de phosphate de soude. Concentration en ABr : N/4000, en glucose : 1 p. 100.

pH	$\frac{N^2}{F}$ CO^2 Témoin	$\frac{N^2}{F}$ CO^2 + ABr N/4000
4	157	0
5		50
6		161
7		172
(8)		165

Le pH initial était le pH indiqué ; ce pH s'abaissait très légèrement au cours de la mesure, d'une manière assez importante en milieu alcalin à pH 8.

5. **Rôle de la concentration en phosphate.**

La fermentation alcoolique dans le suc de presse ou de macération de levure, débute par la formation d'esters hexosephosphoriques. Un élève de NEUBERG a supposé que l'acide halogéné inhibait la formation de ces esters, et par là, arrêtait la fermentation à ses débuts. L'expérience vérifiait partiellement cette conception, puisque l'on peut obtenir dans le suc de levure aux dépens d'hexosediphosphates, une certaine fermentation, pour des concentrations en acide halogéné qui arrêtent toute fermentation aux dépens du sucre.

La cinétique de la fermentation par les cellules vivantes est notablement différente de la cinétique d'un suc de presse de levure. La vitesse de fermentation en particulier est pratiquement indépendante de la concentration en phosphate. J'ai vérifié de même que l'inhibition par l'acide bromacétique était indépendante de la concentration en phosphate, à pH 4,6, pour des concentrations en phosphate allant de N/2 à N/20. Ce résultat s'accorde parfaitement avec ce que nous savons des levures ; il était néanmoins important de le vérifier, car dans le cas de la fermentation lactique, étudiée par Genevois et Nicolaieff, l'inhibition de la fermentation dépend beaucoup de la concentration en phosphate.

6. Races de levures et facteur Z.

L'inhibition par l'acide bromacétique à la concentration limite de N/4000 n'a pas toujours la même valeur, elle est tantôt complète tantôt partielle. Lundsgaard a déjà noté ces variations ; il m'a paru que ces variations provenaient peut-être de la température à laquelle la levure avait été cultivée avant l'expérience ; d'une manière générale la concentration inhibitrice a semblé un peu plus faible en hiver qu'en été. Les levures conservées depuis longtemps en paquet, les levures conservées longtemps en milieu liquide, sont un peu moins sensible que les levures fraîches ou en plein développement.

Il est très important dans ces conditions, si l'on veut comparer diverses races de levures, de les étudier toutes dans des conditions identiques. Les levures étaient cultivées au préalable dans des fioles d'Erlenmeyer, en semi aérobiose, dans 1 cm^3 d'épaisseur d'une solution de saccharose, de phosphate, et d'eau de levure. L'expérience a montré, dans ces conditions que des levures très diverses, mais toutes cultivées à 20° dans les mêmes conditions, donnaient les mêmes résultats. Plusieurs de ces levures n'ayant pas encore été décrites, en voici rapidement l'état civil :

La levure Coutet est une levure de vin de Barsac, (région de Sauternes) prélevée le 2 décembre 1930 sur des vins blancs en pleine fermentation, au Château Coutet. Au moment du prélèvement, la teneur en alcool du vin en fermentation était voisine de 7°. Depuis cette époque la levure a été conservée dans des cultures sur gélose, au saccharose, à l'eau de levure.

Cette levure montrait des cellules elliptiques typiques. Trois expériences rapportées sur le tableau XVIII, montrent qu'elle est sensible à l'action du facteur Z, et sensible à l'action de l'acide bromacétique à N/4000.

La levure 4 est une levure de vin blanc, provenant d'un vin blanc légèrement sucré, refermentant au printemps 1930 ; c'est une levure toruloïde, comme le sont la plupart des levures qui se développent dans les vins presque faits. Malgré ces caractères assez différents de ceux de la levure Coutet, elle présente la même sensibilité physiologique.

TABLEAU XVIII.

Action de l'acide monobromacétique en fonction des races de levures et du facteur Z.

Dates	Levures	Facteur Z	Concentration en ABr	I_{O^2}	$F\frac{CO^2}{CO^2}$
18-2-30	Coutet	+ Z	0	43	228
—	—	+ Z	N/4000	38	0
—	—	0	0	35	118
—	—	0	N/4000	27	0
4-3-31	Coutet	+ Z	0	65	280
—	—	+ Z	N/2000	47	0
7-5-31	Levure 4	+ Z	0	57	177
—	—	+ Z	N/10000	62	52
—	—	+ Z	N/5000	56	0
12-5-31	Levure 4	+ Z	0	20	176
—	—	+ Z	N/5000	20	130
—	—	+ Z	N/2500	16	0
11-5-31	Levure 2	+ Z	0	47	145
—	—	+ Z	N/5000	31	17
11-2-31	Levure 2	0	0	53	182
—	—	0	N/5000	49	0
27-4-31	L. D. 15	+ Z	0	28	216
—	—	+ Z	N/5000	27	15
—	—	+ Z	N/2500	22	0

La levure 2 est une levure de vin rouge, provenant de Chateau-Laffite, en Médoc ; elle se rattache au groupe des levures elliptiques.

La levure L.D. 15 est, au contraire des précédentes, une levure de bière, de fermentation haute, capable de se développer à 37°, et vendue pour des applications thérapeutiques. Elle est caractérisée dans les cultures sur gélose, par un développement très vigoureux. Cette levure se comporte comme les autres, malgré son origine tout à fait différente.

7. Réversibilité.

Au point de vue physiologique il est de première importance de savoir si l'action du corps sur une cellule donnée, est une action définitive, qui subsiste lorsque le corps agissant est éloigné, correspondant à une modification permanente, ou une action temporaire liée à la présence du corps. Les tableaux XIV et XVIII notamment, ont déjà montré que les concentrations arrêtant complètement la fermentation ne modifiaient pas ou extrêmement peu, la respiration. La cellule n'est donc pas tuée ; c'est seulement une de ses fonction qui est arrêtée.

TABLEAU XIX.

Réversibilité de l'action de ABr.

Dates	Levures	Milieu	Quantité ABr	I O^2	F $\frac{CO^2}{CO^2}$
13-5-31	Levure 2	Saccharose PO^4 eau de levure	0	72	149
			N/2500	43	0
			N/2500 centrifug	71	153
18-5-31	Levure 4	Glucose PO^4	0	85	100
			N/5000	72	0
			N/2500	65	0
			N/5000 centrifugé		99
			N/2500 »		33

L'arrêt de la fermentation n'est que temporaire. Si après avoir laissé la levure pendant quelques heures en contact avec

une solution N/4000 ou N/2500 en ABr, nous centrifugeons la levure, puis si nous la replaçons dans une solution sucrée, nous constatons que l'intensité de fermentation revient à peu près à la valeur qu'avait le témoin. L'acide bromacétique est donc combiné d'une façon réversible avec les éléments chimiques de la cellule. Ce résultat a une grosse importance, car il montre, que, au moins à ces concentrations, l'acide bromacétique ne tue nullement les cellules, mais agit avec une exquise délicatesse. L'expérience a été répétée avec diverses levures, pour montrer la généralité du phénomène, levures de vin, levures de bière et levures de boulanger se comportent de même façon. Le tableau XIX donne les chiffres de deux expériences.

C. — Inhibition de la fermentation alcoolique par les divers acides halogénés.

1. Les divers acides chloracétiques.

Ces acides ont déjà été étudiés par les élèves de G. Bertrand, Rosenblatt et Rozenband, en 1909, la méthode d'étude devait être assez voisine de celle des tubes de Einhorn, car ils ont trouvé des concentrations assez élevées. J'ai repris l'étude de ces deux corps par la technique manométrique, qui montrait que dans ces conditions, c'est-à-dire pour un temps court, de l'ordre de quelques quart d'heures, et pour un liquide constamment agité, l'inhibition de la fermentation était complète pour une concentration en acide halogéné, environ 4 à 5 fois plus faible que celle indiquée par les auteurs parisiens. Si l'on détermine avec les tubes de Einhorn, la concentration limite qui inhibe la fermentation on trouve un chiffre qui est plus voisin de celui de Rosenblatt que le chiffre trouvé par la méthode de Warburg. Le tableau XX porte ces concentrations inhibitrices limites, déterminées par la méthode du tube de Einhorn.

En même temps que la fermentation, la respiration a été mesurée, dans tous les cas où l'on a employé la méthode de Warburg. La respiration n'est pas plus altérée que dans le cas de l'acide bromacétique.

TABLEAU XX.

Acide	Acétique		Propionique		Valérianique iso	
pH	4	7	4	7	4	7
Déviré Cl.....	N/200	N/20				
— Br..	N/4000	N/1000	N/400	N/100	N/10	N/10
— I.....	N/4000	N/1000				

2. Acide monoiodacétique.

L'acide monoiodacétique a été beaucoup étudié par les auteurs étrangers, LUNDSGAARD, MEYERHOF, et leurs divers collaborateurs. Cet acide possède en effet sur l'acide bromacétique, l'avantage d'être beaucoup plus aisé à manipuler ; il n'est pas déliquescent ; il ne provoque pas la formation de brûlures s'il est en contact avec la peau. Par contre, l'acide monoiodacétique est beaucoup plus difficile à se procurer dans le commerce, et beaucoup plus coûteux. C'est ce corps surtout qui a été étudié à l'étranger.

L'acide monoiodacétique a un inconvénient assez grave : ses solutions sont beaucoup plus instables que celles de l'acide mnobromacétique ; elles donnent naissance rapidement à de l'iode libre, alors que les solutions d'acide bromacétique ne donnent jamais de brome libre, mais seulement des bromures. A partir du moment où l'on a une solution étendue, l'acide monobromacétique est donc de beaucoup à préférer à l'acide monoiodacétique, instable. Cette raison est la principale pour laquelle j'ai préféré dans toutes mes expériences, les dérivés bromés aux dérivés iodés ; dans les expériences de culture, qui durent 48 heures sur courant d'air, la possibilité de formation d'une quantité notable d'iode libre en milieu suroxygéné, interdit complètement l'emploi du dérivé iodé.

Au reste, au point de vue de l'inhibition de la fermentation en anaérobiose, je n'ai jamais pu déceler de différence entre les deux acides ; la concentration limite d'inhibition en milieu acide est la même pour les deux corps, soit N/4000 environ.

3. Divers acides gras bromés.

Lundsgaard a étudié l'acide bromopropionique, et l'a trouvé beaucoup moins actif que l'acide bromacétique, j'ai réétudié ce corps, et vérifié qu'effectivement il est à peu près inactif à N/1000, mais qu'il est déjà actif à N/500, et qu'il inhibe généralement complètement à N/200. L'acide bromo isovalérianique est encore plus intéressant : il est à peu près complètement inactif par rapport à l'acide bromacétique : il agit à N/50, c'est-à-dire à une concentration 100 fois plus élevée que l'acide bromacétique.

Il apparaît donc bien, de l'étude de ces deux corps, que la position α du brome ne suffit pas à lui conférer une activité physiologique, qu'il faut que le brome soit placé à l'extrémité de la molécule en même temps ; lorqu'il est protégé par un groupe isopropyle comme dans le cas de l'acide bromoisovalérianique, il perd à peu près complètement toute activité.

TABLEAU XXI.

Action des acides. { *α bromopropionique.* / *Mono bromosuccinique.* / *Di bromosuccinique.*

		Témoins		Corps étudiés	
		I O^2	F $\frac{CO^3}{CO^2}$	I O^2	F $\frac{CO^2}{CO^2}$
α bromopropionique	N/1000	36	249	82	201
	N/500			72	10
	N/400			77	0
Mono bromosuccinique	N/100	118	335	72	176
di bromo succinique	N/100			69	191
Mono bromosuccinique	N/10	96	277	0	0
di bromosuccinique	N/10			0	0

Ces faits sont confirmés par l'étude des acides succiniques mono et di bromés : ces corps en solution N/100 commencent tout juste à avoir une action inhibitrice sur la fermentation. Il faut se placer en solution N/50 ou N/30 pour arrêter la fermentation. Ici encore, le brome est pour ainsi dire

bloqué par la seconde fonction acide. Le tableau XXI donne quelques expériences faites avec ces divers corps.

Comparer :

les constantes de dissociation de ces divers acides (T, II et III, p. 1010) ;

les constantes d'hydrolyse (T. IV, p. 1013) ;

les constantes de réaction avec le sulfite (T. VI, p. 1016).

Il y a un parallélisme grossier entre ces dernières constantes et les chiffres ci-dessus.

Il n'y a aucun parallélisme avec le coefficient de partage toluène/eau, benzène/eau, chloroforme/eau (T. I, p. 1008).

D. — Inhibition par les cétones et les aldéhydes halogénés.

La première mention d'une action physiologique d'une aldéhyde halogénée se trouve dans une note de H. Quéré parue en juin 1932 dans les Compte-rendus de la Société de Biologie : l'aldéhyde α bromo oenanthylique et l'aldhéhyde β bromopropionique y étaient signalées comme arrêtant la respiration des ferments acétiques à la concentration de N/4000, le premier de ces corps arrêtait même la croissance à N/50.000. Des expériences faites à la même époque, mais non publiées, avaient montré que ces deux aldéhydes arrêtent la fermentation à la concentration N/2000. Quelques semaines plus tard Simon, à Berlin, publiait que l'aldéhyde iodacétique arrête la fermentation alcoolique à la concentration N/1000. Cette étude a été reprise en 1933, par Genevois et Kirrmann : ils ont publié en mars que toutes les aldéhydes bromées ou iodées en α arrêtent la fermentation alcoolique à la concentration N/1000 et cela, quel que soit le poids moléculaire de l'aldéhyde considérée. D'autre part, l'action inhibitrice de ces aldéhydes est sensiblement indépendante du pH du milieu. Le cas de l'acide bromoisovalérianique, inactif aux concentrations inférieures à N/50, alors que l'aldéhyde correspondante est très active à N/1000, est particulièrement frappant.

Ces deux caractères semblent prouver que le mécanisme d'action des aldéhydes est un peu différent du mécanisme de l'action des acides halogénés. Dans le premier cas, le groupement actif est le groupement RCHBrCHO, actif quel que soit

R ; dans le second cas, le groupement actif est CH^2BrCO^2R, actif quel que soit R.

Genevois et Kirrmann ont étudié de même en mars 1933, les acétones halogénées : la chloracétone est très peu active tandis que la iodacétone et la bromacétone sont actives à N/1000. L'action inhibitrice est encore complète à N/4000, elle est indépendante du pH. Les cellules ne sont pas tuées ; elles se montrent vivantes au rouge neutre après séjour de 24 heures dans la solution diluée d'acétone halogénée.

E. — Absence d'action de divers corps halogénés.

Nous avons étudié quelques corps contenant le groupement COCHBr ou COCBr l'α bromoisovalérylurée qui contient un groupement COCHBr préparé par Poulenc, la bromodiéthylacétylurée, contenant le groupe COCBr, vendue par Bayer sous le nom d'adaline et le dérivé acétylé de ce corps ou acétyladaline (ou abasin bayer). Ces corps aussi bien en solution diluée qu'en solution concentrée se sont montrés entièrement inactifs. Nous n'avons pu noter aucune action ni sur la fermentation ni sur la respiration ce qui démontre bien que seul le groupe CH^2BrCO^2 est actif. Nous avons étudié aussi la diéthylchloracétamide (Déclonal) qui montre une action narcotique et diminue autant la respiration que la fermentation.

Le tableau XXII donne les résultats pour ces différents dérivés de l'urée.

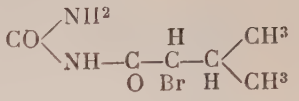
TABLEAU XXII.

Action des dérivés de l'urée.

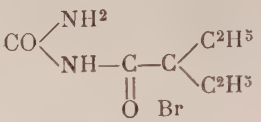
		Témoins		Corps étudiés	
		I O^2	F CO^2	I O^2	F CO^2
Bromociéthylacéthylurée (Poulenc)	N/100	65	203	72	198
id.	N/10	67	165	71	183
Adaline Bayer	N/100	65	203	75	200
Abasin (acétyladaline)	N/100			78	205
Bromo isovalérylurée	N/200	80	217	69	195
	N/10			53	168

Il n'est pas inutile de jeter un coup d'œil sur les formules chimiques de ces divers corps.

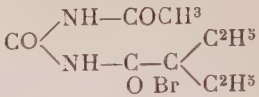
α bromoisovalérylurée (bromural, isobromul dormigène).



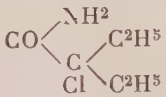
Bromodiéthylacétylurée (adaline, nyctal, carbromal).



Acétyladaline (abasine).



Diéthylchloracétamide (déclonal).



Dans les trois premiers de ces corps, nous trouvons un atome en α par rapport à un groupement carbonyle CO ; c'est pour cette raison que j'ai tenu à les étudier. Leur inactivité manifeste provient sans aucun doute de la présence des groupements méthyle ou éthyle placés sur l'atome de carbone portant le brome ou voisin du brome. L'exemple de ces hypnotiques, qui semblent considérés en pharmacologie comme des corps remarquablement actifs, et qui sont le résultat de longues et patientes recherches, nous montre que les fonctions chimiques étudiées jusqu'ici ont été des fonctions chimiques ayant une affinité presque nulle pour les éléments de la cellule vivante. Les phénomènes présentés par les bromacétates sont d'un tout autre ordre de grandeur.

Si le groupement CH^2Br terminal est indispensable à l'activité physiologique, la présence d'un groupement carboxyle ou tout au moins d'un groupement carbonyle est non moins indispensable à l'activité physiologique. En effet, les alcools correspondants aux dérivés bromés étudiés sont inactifs. Simon a étudié en 1932 l'alcool correspondant à l'acide iodoacétique l'alcool iodétylique : ce corps est inactif, même à la concentration N/1000. J'ai étudié l'alcool tribromoéthylique CBr^3CH^2OH, qui participe aux propriétés anesthésiques du chloroforme et des autres dérivés polyhalogénés : l'alcool tri-

bromoéthylique est inactif à la concentration N/100. L'alcool correspondant à l'aldéhyde bromoisovalérianique qui est l'alcool bromoisoamylique, est également inactif.

Enfin le brome peut bien être remplacé par l'halogène, mais non par un groupement SO^3 : nous avons vu au chapitre I que le bisulfite de soude réagit sur l'acide bromacétique, l'ion SO^2 prenant la place de l'ion Br ; j'ai préparé par ce moyen l'acide acétosulfoné $CH^2SO^3NaCO^2Na$; ce corps est complètement inactif, même à la concentration N/50.

Il a été récemment introduit dans le commerce sous le nom d'abrol, le monoiodométhanesulfonate de Na, CH^2ISO^3Na. Ce corps est un des dérivés organiques les plus riches en iode par rapport à son poids moléculaire. Ce corps est administré par voie buccale en grande quantité aux patients pour rendre opaque aux rayons X les voies digestives. L'expérience a donc montré sur l'homme une absence complète de toxicité, ou d'effet pharmacodynamique. Essayé sur la levure, il s'est montré également complètement inactif, même à la concentration N/100.

Un autre dérivé iodé très curieux a été récemment introduit dans le commerce comme succédané de la teinture d'iode, sous le nom d'iothione ; c'est le corps $CHI^2CHOHCH^3$; il contient donc deux atomes d'iode à côté d'une fonction alcool. Il possède sur la teinture d'iode des avantages considérables : corps incolore, inodore, n'attaquant pas les instruments, pénétrant mieux, plus profondément, sans irritation de la peau. Ces simples qualités suffisent pour montrer que ce corps a une action très ménagée. En fait sur les levures, il s'est montré complètement inactif, comme on pouvait le prévoir par l'absence de groupement carbonyle dans la molécule.

Les dérivés de la quinoléine sont connus pour leur action antiseptique ; parmi ces dérivés, quelques-uns ont été préparés en introduisant un atome d'iode dans la molécule. Sous le nom de yatrène 105, on a lancé récemment un produit antiseptique non irritant, qui est l'acide 7 iodo-8-oxyquinoléine-5-sulfonique. Ce corps contient donc un atome d'iode en ortho par rapport à une fonction phénol, le tout sur un noyau de quinoléine, qui a une certaine réputation d'antiseptique. Ce corps est coloré et la couleur varie suivant l'acidité du milieu. Malgré ces qualités, ce corps est inactif même à N/100.

L'étude des corps précédents a été faite par la méthode rapide des tubes de Einhorn, la durée des observations étant

de 12 à 24 heures ; les récipients contenaient une forte quantité de levure en présence de saccharose phosphatée ; il n'y avait pas dans ces conditions multiplication du nombre des cellules. Il nous faut par conséquent, bien spécifier, que par absence d'action, il est entendu qu'il s'agit ici uniquement de l'action spécifique sur la fermentation alcoolique de la cellule adulte. Certains de ces corps en effet, sont susceptibles d'arrêter le développement des cellules : c'est le cas des dérivés de la quinoléine par exemple ; ces corps employés en concentration N/100, empêchent en effet la fermentation d'un milieu sucré ensemencé avec une très faible quantité de levure.

Nous pouvons distinguer trois manières d'arrêter la fermentation :

1° la cellule reste vivante, mais le ferment zymazique est spécifiquement bloqué ; c'est le cas des dérivés bromés actifs étudiés jusqu'ici.

2° la cellule continue à fermenter et à respirer, mais elle ne peut plus se multiplier. Si le milieu contient une forte proportion de levure, il y aura encore fermentation, due aux cellules introduites. Si le milieu est ensemencé avec quelques cellules, elles ne pourront se multiplier, et seront incapables de faire fermenter le milieu.

3° Les cellules sont brutalement tuées ; respiration et fermentation, et à fortiori, toute multiplication cellulaire sont arrêtées brutalement. J'ai trouvé un corps qui à très faible concentration, N/5.000 possède ce troisième effet : c'est le rivanol, ou lactate de 2 éthoxy-6, 9 diaminoacridine. Ce corps est connu comme un des meilleurs antiseptiques.

Il n'est pas irritant sur les cellules et il peut être injecté dans les tissus. Son action toxique sur les cellules de levure, est vraiment extraordinaire et n'est comparable qu'à un seul complexe, celui de la cystéine et de l'acide bromacétique, que j'ai fait connaître en 1932, et que j'étudierai plus loin. Une suspension de levure dans une solution de saccharose à 10 p. 100 dans du phosphate acide de potasse, est complètement incapable de fermenter pour une concentration en rivanol de N/5000 environ. Les cellules de levure sont tuées, ce que l'on peut constater aisément en étudiant, par la technique des colorations vitales au rouge neutre, les cellules qui ont séjourné pendant quelques heures au contact du corps actif. Le rivanol

est un colorant jaune et même un puissant colorant ; c'est le seul inconvénient à la généralisation pratique de son emploi. Il apparaît que ce corps est capable de colorer la levure, et en la teignant lui ôter toutes ses fonctions vitales.

On verra plus loin au chapitre IV, que les bromacétates organiques ont, en milieu acide, une action toxique à peu près aussi puissante que celle du Rivanol.

F. — Lois générales d'action de ces corps.

Il importe de distinguer deux notions nettement différentes :

La notion de groupement chimique actif, qui se déduit de l'étude comparée d'un grand nombre de dérivés.

La notion du point sensible de la cellule, qui se déduit du mécanisme de l'étude d'inhibition dans le cas d'un corps particulièrement actif.

La première de ces notions a déjà été discutée au fur et à mesure de l'étude des dérivés bromés ; le groupement réellement actif est soit le groupement CH^2XCO^2R ou X représente le brome ou l'iode et R un radical quelconque, (l'étude des esters montrera en effet, une activité chimique des divers esters égale à l'acide seul), soit le groupement RCHXCHO également actif, quel que soit R. Enfin le cas des cétones peut être rattaché, soit au premier, soit au second des cas précédents. Par l'activité des cétones bromés, il semblerait que nous soyons dans le premier cas, celui des acides. Dans ces conditions le groupement $RCHXCOCH^3$ devrait être beaucoup moins actif que le groupement CH^2XCOCH^3. Il sera sans doute un jour possible d'élucider ce problème.

Les deux groupements chimiques actifs ont la propriété de se combiner aux groupements amines libres. Il faut sans doute y voir la raison de leur activité.

Toutefois, nous n'avons pas pour l'instant d'expérience démontrant que ces corps se combinent aux fonctions amines aux dilutions où ils ont été employés.

Il est facile de se rendre compte, dans quelle mesure l'activité de ces corps peut être considérée comme un effet narcotique ; d'une manière plus précise, il est facile de se rendre compte de la quantité nécessaire de molécules, supposées étendues en couches monomoléculaires sur toute la surface

des cellules de levure, et de comparer cette quantité aux quantités de dérivés bromés nécessaires pour l'inhibition. Assimilons la cellule de levure à une sphère dont le rayon soit environ 3 microns ; le volume d'une cellule sera de l'ordre de 10^{-10} cm^3, il y aura par conséquent 10^6 cellules par g. frais de levure. Dans cette hypothèse, la surface totale de ce g. frais de levure sera voisine de 1 m^2. Nous savons par les mesures aux rayons X, que la surface de base d'une molécule d'acide gras, est de 22 unités d'angstroms de surface. Sur une surface de 1 m^2, nous pourrons par conséquent planter 4,5 10^{18} molécules ; la molécule gramme comprenant $6{,}10^{23}$ molécules, il suffira très sensiblement de 1/100.000 de molécule gramme pour couvrir d'une couche monomoléculaire 1 g. frais de levure.

L'expérience a montré que pour des concentrations allant jusqu'à 5 p. 100 de levure fraîche, la concentration inhibitrice était la même ; 1 g. frais de levure distribué dans 20 cm^3 d'une solution N/5000 d'acide bromacétique ne peut plus fermenter ; ces 20 cm^3 contiennent 4.10^{-6} molécules d'acide bromacétique ; or, la quantité d'acide nécessaire pour couvrir d'une couche monomoléculaire cette quantité de levure est de l'ordre de 10^6 molécules, c'est-à-dire d'un ordre de grandeur extrêmement voisin. Il n'est donc pas impossible d'admettre que l'acide halogéné recouvre les surfaces actives de levure, supposées être du même ordre, comme surface, que la surface extérieure de la levure, ou d'une diminution un peu plus faible.

Etant donné que la concentration inhibitrice ne varie pas sensiblement avec la concentration en levure, il faut admettre que l'affinité de l'acide monobromacétique est suffisamment grande pour se précipiter sur les cellules quelle que soit la concentration de celles-ci.

Ce calcul est assez arbitraire, en ce sens qu'il admet que la surface active a une étendue du même ordre que la surface de la cellule de levure ; J. H. Quastel avait développé en 1924 des considérations analogues : pour lui la fermentation se faisait essentiellement à la surface ou du moins dans les couches superficielles de la cellule de levure.

Il est possible d'autre part, d'envisager le point de vue chimique du problème : par kilog frais de levure, 4 millièmes de molécules d'acide bromacétique suffisent pour arrêter la fermentation. Ce kilog frais de levure contient 300 g. de ma-

tières sèches, et environ 100 g. de matières azotées ; il y a par conséquent de l'ordre de 1 atome gramme d'azote engagé dans les matières protéiques ; assurément la plus grande partie de cet azote est engagée dans des noyaux de nucléines ou des peptides et est incapable de réagir avec les réactifs de la fonction NH^2. Il suffit d'admettre que la 250e partie environ de l'azote de la levure est un azote actif, pour expliquer l'inhibition par une combinaison de groupement NH^2 avec les groupements actifs de la substance inhibitrice. WARBURG a établi que la 200e partie maximum de l'hémine existant dans une cellule de levure, jouait dans le ferment respiratoire.

La quantité de molécules nécessaires pour couvrir les levures d'une surface monomoléculaire, et la quantité limite de molécules nécessaires pour arrêter la fermentation, coïncident comme ordre de grandeur : il n'y a peut être là qu'une coïncidence car cette inhibition n'est pas un effet narcotique, mais sans aucun doute un effet chimique. Il est hors de doute toutefois que la fermentation, comme les autres phénomènes de la vie cellulaire, se passe sur des surfaces. Rien ne démontre, pour l'instant que ces surfaces soient celles de l'extérieur de la cellule. Cette coïncidence a paru pourtant assez troublante pour devoir être signalée.

CHAPITRE III.

ACTION DE LA CYSTÉINE.

1. Action des acides aminés autres que la cystéine.

Depuis les travaux de EHRLICH, de NEUBAUER et FROMHERTZ, on connaît le processus de désamination des acides aminés et la formation des alcools supérieurs par la levure à partir de ces acides.

L'acide aminé est comme le glucose, une molécule aliment. Il est oxydé, transformé en hydrates de l'acide iminé, puis à la suite de la perte d'une molécule de NH^3, il fournit l'acide cétonique correspondant qui, par une réaction commune à tous les acides cétoniques, perd un CO^2 et est transformé en aldéhyde puis en alcool éthylique. Cependant, l'acide aminé ne pourra pas être transformé par la levure dans un milieu exempt de sucre. Il faut, pour que la désamination se produise, des corps réducteurs ; la désamination a lieu dans un milieu saccharosé, entraînée par les produits du métabolisme glucidique. La levure pourra alors opérer ses réactions aux dépens de l'acide aminé comme aux dépens du sucre.

Le tableau XXIII donne l'augmentation du $F\frac{CO^2}{CO^2}$ en présence d'alanine, augmentation d'environ 100 p. 100 il ne se passe rien avec la cystéine, ce corps toutefois empêche l'alanine d'être fermentée par la levure. La rapidité du dégagement de CO^2 est donc doublée en présence d'alanine : à la fermentation alcoolique normale s'ajoute la fermentation de l'acide aminé.

La cystéine est sans action sur la fermentation alcoolique aux dépens du sucre, mais elle arrête, semble-t-il, la fermentation de l'alanine. Ce dernier effet peut s'interpréter de la manière suivante : la cellule vivante se combine, par le jeu d'affinités de même nature à la cystéine et à l'alanine, mais

l'affinité est beaucoup plus grande pour la cystéine que pour l'alanine ; la cystéine est infermentescible, la cellule vivante est « bloquée » par la cystéine, ses affinités saturées ne lui permettent plus d'agir sur l'alanine.

TABLEAU XXIII.

Cystéine et Alanine.

Dates		Témoin	+ cystéine 1 g./litre
22-6-32	Levure fraîche Springer. Saccharose phosphatée CO^2 F CO^2	111	112
	+ alanine 1 g./litre	189	109
24-6-32	Levure fraîche Springer CO^2 F CO^2	95	87
	+ alanine 1 g./litre	148	89

2. **Action de la cystéine seule.**

La cystéine est le dérivé thioaminé de l'acide propionique, $CH^2SHCHNH^2COH$, c'est un produit d'hydrolyse des protéines, avec la cystine qui est l'union de deux molécules de cystéine avec perte d'hydrogène. Dans les tissus vivants, notamment dans la cellule de levure la cystéine se rencontre combinée, sous forme d'un tripeptide, le glutathion, à l'acide glutamique et au glycocolle. Le disulfure, cystine, peut être considéré par groupe S.-S comme un accepteur d'hydrogène. Le groupe thiol est auto oxydable, sous l'action des traces de métaux lourds. Il réduit le bleu de méthylène. La forme disulfure se réduit moins facilement en forme thiol que la forme thiol ne s'oxyde.

Clarke en 1932, fait réagir le sulfite sur la cystine, il ne trouve pas formation de sulfate, mais la moitié de la cystine est transformée en cystéine, et l'autre convertie en acide S cystéine sulfonique. Andrews 1932, note qu'en présence de

HCl ou SO^4H^2, la cystine donne de l'acide cystéique et des produits mal déterminés à une vitesse proportionnelle au temps et à la concentration en acide.

Fabre et Simonnet 1931, ont fait connaître que la levure de bière comme les tissus hépatiques, contient des dérivés sulfhidrylés, mais il ne sont libérables de leurs combinaisons qu'à la suite d'un traumatisme entraînant la mort de la cellule. La levure désséchée dans le vide réduit la cystine en cystéine.

La cystine est insoluble dans l'eau. La cystéine est, au contraire, très soluble. On la caractérise par la coloration bleue au perchlorure de fer rouge ou nitroprussiate ammoniacal. On dose enfin le groupe SH à l'iode par l'hyposulfite : si la cystéine se trouve dans un milieu glucosé, en milieu alcalin on dosera SH + OH, mais en milieu acide on ne dosera que le pouvoir réducteur du SH.

On sait (Euler et Svartz 1924) que lorsqu'on ajoute à des levures en train de fermenter en anaérobiose, dans une solution de glucose phosphaté, une petite quantité d'eau de levure ou de moût de bière, la vitesse de fermentation double presque instantanément et se maintient ensuite à cette valeur déterminée. Il existe dans ces deux milieux une substance accélérant catalytiquement la fermentation alcoolique Euler et Svartz ont nommé facteur Z ce facteur hypothétique. Il serait thermostable, dialysable, mais différent de la cozymase.

Si l'on place de la levure en anaérobiose, dans un milieu de glucose phosphaté, additionné de cystéine à la concentration moyenne finale de 1 g. par litre, on aura la même intensité de fermentation que dans le témoin, mais si l'on ajoute une petite quantité d'autolysat de levure (bouillie et filtrée) alors que dans le témoin le dégagement de CO^2 sera deux ou trois fois plus grand,, dans le milieu contenant de la cystéine, on n'observe aucune augmentation, aucun effet Z, et la vitesse de fermentation sera la même que dans le milieu saccharosé phosphaté. La cystine au contraire, n'a aucune action. Le tableau XXIV à des concentrations de cystéine variant de 500 mg. à 5 mg. par litre, note la même action inhibitrice sur l'effet Z. S'il y a moins de 500 mg. litre, l'effet tombe presque toujours à 0. Ici se trouve la dose limite d'action. L'action de la cystéine disparaît dans la fermentation aérobie ou devient très faible.

TABLEAU XXIV.

Effet Z et cystéine.

Dates		Témoins	Cystine 1 g./litre	Cystéine 1 g./litre
16-5-31	Levure Springer			
	CO^2 F CO^2	30	36	35
	+ eau de levure	112	105	38
			cystine 500 mg./l.	cystéine 500 mg./l.
19-6-32	Levure Springer	114	136	114
	+ eau de levure	343	373	107
				cystéine 10 g./litre
21-5-32	Levure Springer	144		144
	+ eau de levure	442		162
				cystéine 3 g./litre
25-5-32	Levure Springer			
	CO^2 F CO^2	133		160
	+ eau de levure	270		158
	O^2			
25-5-32	F CO^2	36		41
	+ eau de levure	140		84

3. Action de la cystéine en présence d'ABr.

a) *Action de la cystéine et d'ABr.* — Si à un milieu contenant de l'acide monobromacétique, à la concentration N/10000, c'est-à-dire à un milieu ou l'inhibition de la fermentation, d'après ce que nous avons vu, est partielle sinon nulle, on ajoute de la cystéine à la dose de 1 g. par litre, l'inhibition devient très rapidement presque totale. Comme on le verra dans le tableau XXV, il est possible d'opérer avec des quanti-

tés très faibles d'acide bromacétique et variables. La concentration de cystéine a toujours été de 1 g. par litre, concentration qui a paru la plus favorable. J'ai essayé d'opérer avec des mélanges équimoléculaires de cystéine et d'ABr. Ces mélanges après digestion puis dilution se sont comportés comme de l'acide bromacétique seul. Il faut un grand excès de cystéine. Mais le complexe qui se forme permet des dilutions énormes, à N/20000 en ABr on a toujours une inhibition quasi-totale. Aux dilutions plus grandes N/50.000, N/100.000 (c'est-à-dire à environ 1 mg. d'acide par litre) on a encore une inhibition de 75 p. 100.

En fermentation aérobie, le phénomène existe encore, mais il est plus faible, il faut songer à l'oxydation de la cystéine par l'oxygène de l'air.

b) *Action de la cystéine + ABr + alanine.* — L'alanine, comme l'ont vu Neuberg et Kobel, 1931, a une action inverse. L'inhibition par un mélange d'acide monobromacétique et d'alanine, est notablement plus faible que par ABr seul. Zuckerkandl, Messiner Klebermass, (1931), ont étudié une série d'amines parmi lesquelles le chlorhydrate de α phénylènediamine et le chlorhydrate d'aniline se sont montrés les plus actifs ; ajoutés à un milieu contenant de l'acide iodacétique, à la dose de N/1000 ils font repartir la fermentation. Au contraire si nous ajoutons de l'alanine à un milieu inhibé par la cystéine et l'acide bromacétique, nous n'avons aucun effet, l'alanine ne fait pas repartir la fermentation. L'action de la cystéine semble bien spécifique. Nous avons vu qu'elle empêchait l'alanine d'être fermentée par la levure mais l'alanine n'empêche pas son action. Le tableau XXVI porte plusieurs expériences dont la dernière utilisant diverses solutions de cystéine ne donne pas de différence.

c) *Action de la cystéine, d'ABr et d'eau de levure.* — Nous avons vu que le facteur Z n'a pas d'influence sur l'inhibition par ABr, qu'il y ait ou non de l'eau de levure du moût de bière dans le milieu, l'inhibition sera la même. Mais si à ce milieu, à condition qu'il soit partiellement inhibé, et contenant de l'eau de levure, nous ajoutons de la cystéine, le complexe ne se formera plus, l'effet inhibiteur ne se produira plus, la cystéine réagira sur l'effet Z et uniquement si la quantité d'eau de levure est importante (10 p. 100 par exemple). Tou-

TABLEAU XXV.

27-5-32	Sacchoromyces Pasteurianus	Saccharose PO^4	Témoins	+ ABr N/20000	+ ABr N/20000 + cystéine 1 g /l.
		CO^2 F CO^2	105	90	9
10-6-31	Levure Springer		368	372	7
6-6-31	Levure Springer		125	126	14
22-6 32	Levure Springer		ABr N/50000	ABr N/50000 + cystéine 1 g./l.	ABr N/100000 + cystéine 1 g./l.
		I O^2	54	42	45
		CO^2 F CO^2	318	79	98
15-6 31	Levure Springer		ABr N/20000	Abr. N/20000 + cystéine 1 g./l.	
		O^2 F CO^2	40	28	
		CO^2 F CO^2	162	17	

TABLEAU XXVI.

Action de la cystéine, ABr et Alanine.

22-6-33	Saccharomycces Pasteurianus	Saccharose PO^4	Témoin	ABr N/8000	Abr N/8000 + alanine 1 g./l.
		F CO^2	105	72	145
27-6-33	Levure Springer	F CO^2		ABr N/50000	ABr N/50000 + cystéine 1 g./l.
				318	79
	+ alanine 1 g./l.			443	43
20-6-32	Levure Springer	F CO^2		+ cystéine 1 g./l.	ABr N/10000 + cystéine 1 g./l.
			103	94	8
	+ alanine 1 g./l,		180	98	7

20-6-32	Levure Springer	F CO^2	Abr N/20000	+ cystéine 1 g./l (I)	+ cystéine 1 g./l. (II)	+ cystéine 1 g./l. (III)
			100	3	13	11
	+ alanine 1 g./l.		148	0	9	7

La solution I date de 30 jours, la solution II date de 15 jours, la solution III est extemporanée.

tefois si la quantité d'eau de levure est très faible, 1 à 0,5 p. 100, nous aurons inhibition de la fermentation. Il est curieux de voir que la cystéine est davantage attirée vers l'eau de levure qui est une solution d'acide aminé, que vers l'acide bromacétique. On peut s'étonner cependant que l'alanine ne puisse empêcher l'action du complexe cystéine acide bromacétique, alors que l'eau de levure le peut complètement.

TABLEAU XXVII.

Action de la cystéine, ABr, Eau de levure.

10-6-31	Levure Springer Saccharose PO⁴	Abr N/15000		ABr N/15000 + cystéine 1 g./l.	ABr N/15000 + cystine 1 g./l. + eau de levure
		375		7	191
13-6-31	Levure Springer Saccharose PO⁴	ABr N/15000	ABr N/15000 + eau de levure	ABr N/15000 + cystéine 1 g./l.	ABr N/15000 + cystéine 1 g./l. + eau de levure
		133	229	0	146

d) *Le pH.* Nous savons qu'à pH 7 l'action de l'acide monobromacétique tombe à 0 quand les concentrations sont très faibles (N/4000) alors qu'à pH 4 elle est totale. Nous avons placé les milieux contenant cystéine et acide bromacétique N/20.000 à pH 4 et à pH 7. A pH 7 nous n'avons plus aucune action et nous sommes obligés d'employer une dose plus grande d'acide bromacétique pour avoir l'inhibition complète que nous avons à pH 4.

4. **Bilan de la fermentation en présence de cystéine et d'Abr.**

Nous avons voulu savoir si la cystéine alliée à ABr empêchait complètement la fermentation ou si par son groupe réducteur, faisait dévier le processus de fermentation, si au lieu d'avoir de l'alcool éthylique et du CO^2, nous avions de

la glycérine. Nous avons cherché à déceler la glycérine dans des milieux contenant cystéine et ABr et où aucun dégagement gazeux n'avait eu lieu. Nous avons employé l'excellente méthode de DENIGÈS, qui permet de déceler des quantités infimes de glycérine. Le principe est de transformer grâce au brome, la glycérine en dioxycétone, puis par l'action consécutive de SO^4H^2, obtenir le méthylglyoxal par l'anhydrisation interne, qui lui, est facilement décelable. On prend 10 cm³ du liquide centrifugé, on ajoute 10 cm³ d'eau de brome à 0,5 p. 100, on porte au bain-marie bouillant dans un épais tube à essai pendant 20 minutes, on laisse refroidir, on ajoute 0 cm³,1 de KBr à 4 p. 100 et 2 cm³ de SO^4H^2 pur (D = 1,84). On agite, on ajoute enfin 0 cm³,1 d'une solution alcoolique de l'acide salicylique au 1/20. En portant au bain-marie bouillant on obtient une belle coloration rouge vineux. La réaction est très caractéristique. On peut remplacer l'acide salicylique par le gaiacol (coloration bleue) par le salicylate de méthyle (coloration violette à froid passant rouge orangé), tous nos résultats ont été négatifs.

Pour vérifier si le sucre n'était pas attaqué, nous avons voulu doser le glucose et la cystéine par l'iode et l'hyposulfite. Sachant qu'on dose le glucose en milieu alcalin, en milieu acide nous ne dosions que le SH réducteur de la cystéine, en milieu alcalin la cystéine plus le glucose. Nous avons pris le milieu suivant :

levure Springer	5 g. par litre
glucose	1 g. par litre
Cystéine	1 g. par litre
ABr N/20.000	

nous avons pris un témoin, un témoin + cystéine et un récipient contenant cystéine et ABr. Il était inutile de faire un témoin avec ABr qui à N/20000 ne peut avoir aucune action. Nos dosages ont été faits en employant de l'iode N/10 et de l'hyposulfite N/100. Nous donnons les résultats dans le tableau XXVIII nous voyons que le glucose a diminué de moitié dans le témoin avec glucose aussi bien que dans le témoin avec glucose + cystéine ; dans le milieu contenant cystéine et ABr nous retrouvons la même quantité de glucose. Nous n'avons donc aucune attaque du sucre et nous avons bien affaire à une inhibition spécifique.

TABLEAU XXVIII.

Dosage du glucose et de la cystéine par l'iode dans un milieu de fermentation. Les chiffres donnés sont des cm³ d'hyposulfite N/100.

	Avant la fermentation		Après 6 h. de fermentation	
Glucose		59		26
Glucose + cystéine acide	9	57,5	8,8	27
— — alcalin	66,5		35,5	
Glucose + cystéine + ABr acide	8,5	57,7	9,2	57,8
— — — alcalin	66,2		67,0	

5. **Culture des levures en présence de ABr et de cystéine.**

Ayant vu l'action puissante du complexe cystéine-ABr, sur la fermentation alcoolique, nous avons voulu voir son action sur le développement cellulaire. Nous avons opéré en courant d'air dans des fioles tubulées que nous décrirons plus longuement au chapitre V. L'air débarrassé de germes et de poussières, entraîné par une trompe à vide barbotte dans chaque récipient. Au bout de 48 heures, on prend un volume connu, on centrifuge le culot de levures est lavé à l'eau, séché et pesé. On opère dans le milieu ayant la constitution suivante :

saccharose 10 p. 100.
eau de levure 2 p. 100.
PO^4KH^2 N/10.
ABr N/10000 Cystéine 1 g./litre.

Nous donnons les résultats dans le tableau XXIX nous voyons que dans le témoin, la croissance est de 1 à 10, il en est de même dans le témoin plus cystéine, dans le milieu contenant ABr, la croissance quoique plus faible, est du même ordre de grandeur, mais dans le milieu contenant ABr et cystéine, nous notons une très faible croissance du simple au double. Les cellules ont au microscope un aspect granuleux, elles sont plus petites que dans les témoins, nous avons affaire à un effet toxique certain. Pour noter la fermentation, nous avons placé des différents milieux en anaérobiose dans les tubes

d'Einhorn, elle a été complète dans le témoin et dans le témoin contenant la cystéine seule, faible (environ 30 p. 100) dans le milieu contenant ABr N/10000, nulle dans le milieu acide bromacétique et cystéine. Nous avons alors observé les cellules au rouge neutre, nous avons noté que les cellules étaient bien vivantes dans les différents milieux, donnaient la coloration vitale, sauf dans le milieu contenant ABr et cystéine. Dans ce milieu en effet 98 p. 100 des cellules étaient mortes.

La cystéine était toujours présente dans le milieu et donnait la coloration bleu fugace au perchlorure de fer, mais la coloration était moins vive et moins nette ; il est certain qu'une partie de la cystéine avait été oxydée après 48 heures de barbottage à l'air.

Nous concluons que la toxicité du complexe ABr et cystéine est très grande puisqu'elle entrave presque complètement toute croissance aérobie et qu'elle tue les cellules en anaérobiose.

TABLEAU XXIX.

Effet de la cystéine sur la croissance en présence d'acide bromacétique. Levure Springer, saccharose 10 p. 100, eau de levure 2 p. 100 PO^4KH^2 N/10 (les chiffres sont des mg. sec par litre).

	30-11-32	2-12-32	$\frac{CO^2}{F}$ CO^2	Examen microscopique après 24 h. d'anaérobiose
Témoin.....	150	1500	Total	98 p. 100 vivants
+ Cystéine 1 g./lit...	150	1520	—	98 p. 100 —
ABr N/10000.....	150	1100	30 p. 100	80 p. 100 —
ABr N/10.000 + cystéine 1 g./litre	150	340	0	98 p. 100 morts

6. Spécificité de l'action de la cystéine vis-à-vis d'autres corps sulfurés et d'autres corps halogénés.

a) La cystine n'a aucune action sur l'acide bromacétique mais elle est très insoluble, aussi avons nous étudié d'autres corps dont nous disposions, particulièrement la sulfo urée $CS\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix}$ et la thiosinnamine qui est son dérivé $CS\begin{matrix}NHC^3H^5\\NH^2\end{matrix}$

Ces corps semblent augmenter légèrement l'action de l'acide bromacétique. Alors qu'à N/10.000. ABr n'inhibe presque jamais la fermentation, l'addition de ces corps l'arrête presque toujours entièrement, mais on ne peut aller à une plus grande dilution de l'acide bromacétique. De plus, on n'a plus besoin d'un grand excès du corps, une solution équimoléculaire de thiosinnamine et d'ABr semble au contraire préférable.

b) Nous avons étudié d'autres corps halogénés, l'acide iodacétique n'a pas l'activité de l'acide bromacétique. Le complexe cystéine iodacétique ne peut agir qu'avec une concentration d'au moins N/10.000 en acide. Avec l'acide bromopropionique et isobromovalérianique dont les actions propres sont faibles on ne note pour ainsi dire aucune action. Il en est de même de l'acide monochloracétique, l'explication en est facile puisqu'on sait que le chlore est beaucoup moins actif que le brome dans les réactions organiques.

c) L'aldéhyde bromoeonanthylique a une action forte, mais nous n'avons noté aucune action avec la cystéine. Il en est de même avec tous les esters bromés, il semble donc bien que l'action de la cystéine soit bien spécifique de l'acide monobromacétique.

CHAPITRE IV.

ACTION DES ESTERS HALOGÉNÉS SUR LA CELLULE DE LEVURE.

1. Inhibition de la respiration et de la fermentation par les esters de l'acide monobromacétique.

Les esters de l'acide monobromacétique arrêtent la fermentation en apparence de même façon que l'acide monobromacétique lui-même. Le fait a déjà été signalé par les divers auteurs qui se sont occupés de l'action de l'acide monobromacétique. Schwartz et Oschmann par exemple, ont noté sur le muscle la même action du bromacétate d'éthyle et de l'acide bromacétique sur la formation de l'acide lactique dans le muscle. Krebs a arrêté de même la fermentation lactique dans les divers tissus par le monobromacétate d'éthyle. Tous ces auteurs se sont contentés de faire appel au monobromacétate d'éthyle, corps volatil très lacrymogène, désagréable à manipuler. Ils ont fait une étude rapide de cette inhibition et l'ont confondue avec l'inhibition produite par l'acide monobromacétique.

Il était du plus haut intérêt de reprendre ce phénomène avec des bromacétates d'alcools très divers, et surtout d'alcools non volatils, donnant des esters faciles à manipuler ; c'est le cas des bromacétates d'amyle et d'alcools alyphatiques supérieurs, de poliyalcools, d'alcools aromatiques ou d'alcools-éthers, comme l'éthylglycol. Les propriétés de ces corps au point de vue physique et chimique ont été passées en revue en seconde partie du chapitre I.

Une première étude rapide de ces corps, en suivant la fermentation d'une façon qualitative, dans les tubes de Einhorn, conduit aux résultats suivants :

L'inhibition de la fermentation se produit en milieu acide à pH 5, à une concentration au moins égale à N/4000 et aux

concentrations supérieures ; cette concentration est en première approximation, indépendante de la nature de l'alcool estérifiant la fonction acide. Il semblerait ainsi que les esters se comportassent exactement comme les bromacétates minéraux, qui existent seuls en solution à pH 5.

Si l'on se place en milieu neutre, dans un tampon de phosphate de soude et de potasse à pH 7, les bromacétates organiques arrêtent la fermentation à la même concentration en première approximation qu'en milieu acide. Le lecteur a vu que les bromacétates sont 4 à 5 fois moins actifs en milieu neutre qu'en milieu acide.

Ce second fait montre que l'action inhibitrice des bromacétates organiques est beaucoup plus profonde que celle de l'acide bromacétique. Il suffit pour s'en convaincre d'étudier l'inhibition, cette fois non plus par la méthode qualitative des tubes clos, mais par la méthode quantitative de WARBURG. On constate dans ces conditions que non seulement la fermentation est inhibée complètement à N/4000, mais encore la respiration est inhibée de façon complète. Si à la fin de la mesure, on étudie la levure par la méthode des colorations vitales (voir chapitre V), on constate, que la levure est tuée par les concentrations en bromacétate qui arrêtent respiration et fermentation. Nous ne nous trouvons donc plus en présence d'une action inhibitrice spécifique de la fermentation, mais nous sommes en présence d'une action toxique très violente qui tue, au moins en milieu légèrement acide, les cellules d'une manière complète.

LUNDSGAARD a montré que si l'on se place en milieu trop acide, pour un pH inférieur à 3, les cellules de levure sont tuées par l'acide monobromacétique ; d'autre part, pour un pH de l'ordre de 7, on n'obtient plus l'inhibition de la fermentation. Toutefois, dans une large zône qui va pour la plupart des levures de 3 à 6, c'est-à-dire précisément les conditions optima et habituelles de développement des levures, il y a inhibition spécifique de la fermentation, sans que la respiration soit atteinte, — j'en ai donné de nombreux exemples au chapitre II, — et sans que la croissance soit atteinte — le chapitre V en donnera encore de nombreux exemples. Le tableau XXX donne pour trois bromacétates de type différent, l'un relativement très soluble dans l'eau, le bromacétate d'éthylglycol, l'autre très peu soluble dans l'eau, le broma-

cétate de phénétyle et enfin une graisse bromée que l'on pourrait nommer la tribromacétine, partout à N/4000 l'inhibition de la respiration et de la fermentation en milieu de phosphate acide. A N/8000 l'inhibition n'est plus que très partielle.

Cette étude résume d'une façon évidente, que

1° L'action inhibitrice sur la fermentation dépend uniquement du groupement CH^2BrCO^2.

2° L'action inhibitrice sur la respiration s'ajoute à la première, non pas sans doute par le fait de la neutralisation de la fonction acide organique, mais par le fait du passage d'un corps très peu soluble dans les graisses (voir le coefficient de partage des acides halogénés au § 2 de la première partie du chapitre I) à un corps qui devient plus soluble dans les graisses que dans l'eau.

Il y a là un phénomène entièrement nouveau, et qu'aucun des nombreux auteurs qui se sont occupés dans ces dernières années des dérivés halogénés, n'ont encore signalé. Il est vrai que beaucoup de ces auteurs ont étudié directement l'action de ces corps sur la cellule animale, qui est une cellule fragile, compliquée, difficile à manipuler, et sur laquelle les phénomènes de la physiologie cellulaire ne sont pas toujours faciles à mettre en évidence sous leur forme la plus générale.

TABLEAU XXX.

Intensité de respiration et de fermentation des cellules de levure en présence d'ester bromé.

1 mg. sec. cm^3.

Milieu : Saccharose 10 p. 100 PO^4KH^2 N/10.

	Témoin		Corps étudié	
	I O^2	F CO^2	I O^2	F CO^2
Bromacétate d'éthylglycol N/4000	68	156	0	0
Bromacétate de phénéthyle N/4000 ...	56	172	0	0
Bromacétate de glycérol N/4000.....	68	156	0	0
— — N/8000.....			45	112

(Un milieu neutre, dans un mélange de PO^4KH^2 et de PO^4Na^2H de pH égal à 7, donne des résultats identiques).

2. Inhibition par les chloracétates.

Un certain nombre de chloracétates organiques, correspondant aux bromacétates, ont été étudiés de même façon. De même que l'acide chloracétique est en chiffres ronds dix fois moins actif que l'acide bromacétique, de même les chloracétates sont, en chiffres ronds, dix fois moins actifs que les bromacétates. Le tableau XXXI porte la concentration inhibitrice limite des différents esters organiques halogénés pour divers pH. Cette concentration a été mesurée de façon approchée au moyen des tubes de EINHORN. Pour la plupart des chloracétates, elle se place aux environs de N/400, chloracétates de benzyle, de glycol et d'éthylglycol ; le chloracétate de phénéthyle a paru un peu plus actif (N/800). Tout cela en milieu acide, à un pH voisin de 4. Si l'on passe en milieu neutre, à pH 7, une différence apparaît : les chloracétates perdent encore de leur activité ; ils n'inhibent plus qu'à N/100, alors que les bromacétates restent aussi actifs qu'en milieu acide. L'activité du groupement chimique CH^2ClCO^2, apparaît ainsi comme beaucoup plus faible que celle du groupement chimique CH^2BrCO^2.

Il suffit de protéger l'atome de brome par un groupement CH^2 pour voir l'activité diminuer tout de suite dans la proportion de 5 à 1 : c'est ce qui se passe pour les bromopropionates de méthyle et d'éthyle, dont la concentration inhibitrice limite est également portée sur le tableau XXXI.

Cette concentration d'ailleurs, comme pour les bromacétates, est indépendante du pH.

Il en résulte que si l'on voulait chercher parmi les dérivés halogénés, un corps antiseptique, on serait amené à chercher, selon les indications du tableau XXXI, parmi les bromacétates, un corps maniable, c'est-à-dire qui puisse se dissoudre dans un liquide aqueux sans trop de difficultés et sans lui donner de mauvais goût. Il faudrait envisager également la stabilité de ce bromacétate en fonction du temps. Le problème se trouve là beaucoup plus difficile, car en milieu très dilué tous ces esters s'hydrolysent nécessairement, avec une vitesse qui est malheureusement grande vis-à-vis des durées que l'on doit envisager dans la pratique, et qui sont de l'ordre de plusieurs années.

TABLEAU XXXI.

Action des différents esters à différents pH sur la fermentation.

Alcool	Acétique				Propionique	
	pH 4		7		pH 4	7
	Br	Cl	Br	Cl	Br	Br
Méthyle	N/4000		N/4000		N/800	N/800
Ethyle	N/4000		N/4000		N/800	N/800
Propyle	N/4000		N/4000			
Amyle	N/4000		N/4000			
Octyle	N/4000		N/4000			
Benzyle	N/4000	N/400	N/4000	N/100		
Phénéthyle	N/4000	N/800	N/4000	N/100		
Glycol	N/4000	N/400	N/4000	N/100		
Ethylglycol	N/4000	N/400	N/4000	N/100		
Glycérol	N/6000		N/6000			

Comparer ces chiffres aux constantes de réaction des bromacétates et chloracétates sur les sulfites et hyposulfites, tableau XIII, p. 1024.

3. Inhibition de la croissance par ces divers esters.

La toxicité des esters halogénés organiques, révélée par la disparition de l'intensité respiratoire, par les caractères de coloration vitale, doit apparaître également dans les expériences de culture. C'est ce que l'expérience a vérifié. Que l'on fasse des cultures en milieu liquide, stagnant où parcouru par un courant d'air, ou dans un milieu solidifié par de la gélose, que le milieu contienne de l'autolysat de levure ou du jus de raisin, pourvu que le milieu soit acide et le pH inférieur à 5, la croissance est inhibée par les mêmes concentrations que celles qui inhibent la fermentation. Un grand nombre d'expériences ont été faites à ce sujet, dont certaines en collaboration avec Mlle Nicolaieff, et publiées le 15 mars 1933. Les chloracétates se comportent, en milieu acide, comme pour l'inhibition de la fermentation.

Le phénomène change complètement, si, au lieu de se placer en milieu acide, on se place en milieu neutre ; l'action de ces divers esters halogénés sur la croissance des microorganismes diminue dans des proportions considérables, des concentrations telles que N/1000 n'ont plus aucune action inhibitrice, pour des pH supérieurs à 5 ; pour un pH de 6, il faut déjà dépasser une concentration de N/200, et il faut au moins N/100 pour être sûr d'arrêter la croissance. A pH 7 il faudrait encore augmenter considérablement la concentration pour obtenir un résultat antiseptique.

TABLEAU XXXII.

Culture des levures en présence d'esters.

pH = 4,5.

Date	Levure	Milieu	Quantité d'ester	Temps de croissance		$\frac{I}{O^2}$	$\frac{CO^2}{F\ CO^2}$
				0 h.	48 h.		
1-12-31	Cl	jus de raisin	0	18	1.100	53	182
			ABr N/5000	18	830	49	0
			$BrCH^3$ N/5000	18	18		
			BrC^2H^5 N/5000	18	18		
14-12-32	Springer	eau de levure	0	40	880		total
			ABr N/4000	40	650		0
			Br éthylglycol N/4000	40	40		

Le tableau XXXII porte quelques expériences faites avec divers bromacétates, comparés à l'acide bromacétique ; ces expériences étaient faites dans des ballons tubulés stériles balayés par un courant d'air, selon la technique qui sera indiquée au chapitre suivant. Alors que dans l'acide bromacétique il y a une croissance presque normale, les bromacétates, qu'il s'agisse du bromacétate de méthyle, d'éthyle, ou d'éthylglycol, ne permettent absolument aucune croissance. L'expérience a été répétée avec la levure Cl qui est une levure de vin rouge, et la levure Springer qui est une levure de boulangerie, et cela à des pH inférieurs à 5.

L'extraordinaire diminution de l'activité de l'action antiseptique des bromacétates, lorsque le pH croît, peut être rapportée à deux faits :

1° ou à l'inactivation de la fonction CH^2Br,

2° ou à l'hydrolyse, plutôt à la saponification de l'ester.

Le premier phénomène joue seul très certainement, dans les expériences dont la durée ne dépasse pas quelques heures. Vis-à-vis de la fermentation, les bromacétates organiques agissent en milieu neutre, beaucoup plus énergiquement que les bromacétates minéraux. Ce fait ne s'expliquerait pas si l'hydrolyse était instantanée au contact des cellules vivantes. Le second phénomène intervient peut être pour des expériences de longue durée, portant sur une huitaine de jours, où l'on étudie la croissance des microorganismes.

Ce qui est certain, c'est que dans des expériences de quelques heures, les bromacétates organiques ont une action toxique très prononcée, en milieu neutre, de pH égal à 7 (mélange de PO^4Na^2H et de PO^4 KH^2 N/20). La respiration et la fermentation s'annulent en même temps. La coloration par le rouge neutre montre que les cellules sont tuées, au moins pour la plus grande part.

4. **Absence d'action des complexes d'hexaméthylènetétramine.**

Un moyen très élégant de démontrer la spécificité d'action du groupement CH^2BrCO^2, consiste à le bloquer en le combinant à l'hexaméthylène-tétramine. On sait que la réaction des bromacétates organiques sur l'hexaméthylène-tétramine, étudiée par divers auteurs, dont Locquin (1900). Jacobs et Heidelberger (1915) Hahn et Walter (1921) se fait en solution chloroformique, d'une façon quantitative et complète et pratiquement instantanée à la température ordinaire. Ces détails montrent bien l'énergique affinité des deux corps l'un pour l'autre. Aussi les dérivés complexes obtenus, qui sont des cristaux très solubles dans l'eau, alors que les bromacétates purs sont des huiles presque insolubles dans l'eau, n'ont plus aucune de leurs propriétés physiologiques. Employés à la concentration de 5 g. par litre, ils n'ont aucune action sur la fermentation ; la concentration était de l'ordre de N/100. Les levures se retrouvaient à la fin de l'expérience en parfait état. D'autres détails, sur ces expériences seraient sans intérêt ; le seul point remarquable est l'inactivité complète du groupement actif CH^2BrCO^2 lorsqu'il est énergiquement bloqué par le groupement de l'hexaméthylène-tétramine. L'action des autres amines a été étudiée au chapitre III.

5. Mélange d'esters et de cystéine.

Le chapitre III a décrit l'inhibition à des concentrations très faibles d'acides monobromacétique en présence d'une certaine concentration, de l'ordre N/500, de cystéine. L'expérience répétée avec des esters, donne des résultats tout différents : l'inhibition dans un mélange d'ester bromacétique et de cystéine apparaît aux mêmes concentrations que chez les bromacétates seuls. Il semble donc que la condition nécessaire de l'activité ordinaire du mélange d'acide bromacétique et de cystéine, soit la liberté de la fonction acide. Déjà en milieu alcalin, l'action du mélange d'acide bromacétique et de cystéine, revient à l'action de l'acide halogéné seul. Or, ce n'est qu'en milieu acide que la fonction amine de la cystéine est libérée ; en milieu neutre ou alcalin elle est complètement bloquée. On peut en conclure à titre d'hypothèse vraisemblable, que l'élément actif du complexe est un bromacétate de cystéine.

La thiosinamine renforce légèrement l'action de l'acide bromacétique ; elle ne renforce point l'action des esters. En milieu concentré dans le chloroforme, thiosinamine et ester halogéné se combinent pour former un dérivé cristallisé non sans analogie avec les dérivés d'hexaméthylène-tétramine. Ce dérivé cristallisé, préparé à partir du bromacétate d'éthylglycol s'est révélé complètement inactif.

CHAPITRE V.

INHIBITION DE LA FERMENTATION SANS INHIBITION DE LA CROISSANCE.

1. Relation entre respiration, fermentation réaction de Pasteur-Meyerhof et croissance cellulaire.

Les chapitres précédents, ont montré que, certains dérivés halogénés arrêtent spécifiquement la fermentation, sans arrêter la respiration. Il importe de savoir la conséquence pour la cellule de levure, de l'arrêt des phénomènes de fermentation.

D'après les notions acquises jusqu'ici en physiologie cellulaire, la cellule a besoin, pour croître, d'au moins une réaction productrice d'énergie. En l'absence d'oxygène, cette réaction est la fermentation ; en présence d'oxygène, il y a chez les levures typiques, à la fois respiration et fermentation.

Respiration et fermentation sont des phénomènes différents et par leur substrat, et par leur mécanisme. S'il est démontré, chez les anaérobies facultatifs comme la levure, que la croissance puisse se passer de la respiration, il n'avait pas été encore démontré que la croissance puisse se passer de la fermentation.

En 1925, O. Meyerhof s'appuyant sur la définition de Pasteur, « la fermentation c'est la vie sans air », considère que dans la cellule en anaérobiose, rien n'est modifié par rapport à la cellule en aérobiose, sinon les réactions liées à l'oxygène libre. La fermentation anaérobie n'est nullement un phénomène pathologique, mais la suite naturelle des réactions existant déjà normalement dans la cellule aérobie. En aérobiose trois phénomènes se poursuivent simultanément :

1° La fermentation des glucides qui peut être nulle si la cellule n'a pas de glucides à sa disposition, si elle se trouve par exemple dans une solution minérale ou alcoolique.

2° La respiration qui est la combustion lente d'une série diverse de molécules organiques : alcools, aldéhyde éthylique, acides acétique, lactique, pyruvique, sucres fermentescibles.

3° La réaction de PASTEUR-MEYERHOF, synthèse des glucides liée à la respiration et prenant pour matériaux soit les molécules oxydées, soit les produits de la fermentation cellulaire. Dans ce cas la fermentation aérobie est diminuée d'autant. C'est vraisemblablement le méthylglyoxal qui est resynthétisé. Dans la cellule végétale comme dans la cellule animale, il représente le premier produit de dédoublement de la fermentation alcoolique ou lactique. Ce n'est pas l'alcool car s'il en était ainsi, le CO^2 dégagé en aérobiose serait supérieur au CO^2 dégagé en anaérobiose et c'est l'inverse qui se passe.

La réaction de PASTEUR-MEYERHOF permet à la cellule soit de levure, soit de muscle, de reconstituer son glycogène, en milieu aérobie, aux dépens de diverses molécules autre que des sucres, par exemple des lactates. MEYERHOF a montré que pour une molécule d'oxygène consommée dans la respiration, une à deux molécules d'acide lactique, — ou de son équivalent, le méthylglyoxal, — sont retransformées en glucides. Ce résultat est un fait d'expérience, résultant immédiatement des bilans d'analyse chimique de muscle se reposant en présence de lactate, — lactate produit par le muscle lui-même dans son travail, ou lactate apporté de l'extérieur au muscle. Le quotient du nombre des molécules d'acide lactique ou de son équivalent retransformé en glycogène, par le nombre de molécules d'oxygène, s'appelle le quotient de MEYERHOF : il a pu être mesuré, non seulement directement dans le cas du muscle, mais encore indirectement dans le cas du muscle, d'un grand nombre de cellules animales et végétales ; il a été constamment compris entre 1 et 2 ; l'exposé des principaux résultats acquis sur ce phénomène jusqu'en 1930, se trouve dans l'opuscule de L. GENEVOIS, « Métabolisme et fonction des cellules ». Depuis ce travail, la réaction de PASTEUR-MEYERHOF a été retrouvée par Marc CHAPEAU chez les Mollusques marins comme l'Huître.

Dans la conception de MEYERHOF, la fermentation continue normalement dans la cellule, même en présence d'oxygène ; ni l'oxygène, ni un peroxyde dérivé, n'agissent sur la fermenta-

tion. Si la fermentation n'apparaît pas dans l'air en présence d'oxygène, c'est parce que les produits de la fermentation sont dans la plupart des cellules retransformés avec une vitesse suffisante pour ne pas apparaître à l'extérieur de la cellule. Il y a donc à l'intérieur de la cellule un cycle continu de fermentation et de synthèse ; chez les cellules comme la levure, haute typique, où l'intensité de fermentation est très élevée, l'intensité respiratoire relativement faible, l'alcool qui apparaît en présence d'oxygène, n'est que le résidu non transformé des produits de fermentation qui ont échappés à la réaction de Pasteur-Meyerhof ; ils ont échappé parce que l'intensité respiratoire était insuffisante pour les faire entrer dans les synthèses. Ce raisonnement s'applique à toutes les cellules animales en voie de croissance, douées d'une fermentation lactique intense, et où apparaît, exactement comme chez les levures typiques, une certaine quantité d'acide lactique même en présence d'oxygène.

La fermentation est donc un phénomène continu, présenté d'une façon particulièrement intense par les cellules en voie de croissance rapide, qu'elles soient ou non dans l'oxygène. Il pouvait être tentant d'admettre que la cellule en croissance rapide trouve l'énergie qui lui est nécessaire sous une forme particulièrement utilisable dans la fermentation ; la respiration interviendrait ainsi uniquement pour débarrasser la cellule des produits de la fermentation. Si cette conception était vraie, en arrêtant la fermentation sans arrêter la respiration, on devrait arrêter la croissance : la respiration continuerait à brûler des molécules quelconques sans aucun profit pour la cellule. L'expérience a montré que cette hypothèse était inexacte : l'arrêt de la fermentation sans arrêt de la respiration, n'arrête pas la croissance ; la vitesse de multiplication des cellules reste sensiblement la même, dans un milieu saturé d'oxygène, qu'il y ait ou non un bromacétate minéral en quantité suffisante pour arrêter la fermentation.

Ce résultat présente une importance assez considérable : voici une cellule de levure qui vient de se multiplier pendant un grand nombre de générations au dépens de la seule fermentation alcoolique en anaérobiose ; nous la plaçons brusquement en milieu aérobie en lui interdisant toute fermentation au moyen d'un dérivé halogéné ; la cellule continue à croître, avec la même vitesse que les témoins qui fermentent dans une solution sucrée ordinaire.

Il apparaît donc que la croissance cellulaire, où les synthèses sont particulièrement rapides — la masse des cellules doublait dans les expériences en 5 à 6 heures en moyenne — est possible tout aussi bien aux dépens de la fermentation qu'aux dépens de la respiration : ces deux réactions productrices d'énergie n'interviendraient donc pas par leur mécanisme chimique ; la seule chose qui intéresse la cellule est l'énergie fournie par ces réactions ; tout se passe comme si la croissance cellulaire était une chaudière de machine à vapeur : la machine à vapeur fonctionne également bien, que la chaudière soit chauffée par du charbon, du mazout, ou par des résistances électriques, pourvu que la quantité d'énergie fournie par unité de temps soit la même. Il est un peu inattendu de trouver dans les cellules une pareille faculté d'adaptation ; il apparaît pourtant, d'après les recherches les plus récentes qu'il s'agit ici réellement d'une propriété tout à fait générale de la cellule. Cette conception vient d'être développée par L. Genevois dans un article récent (Biologie médicale 1933), à propos des recherches de H. A. Krebs qui a montré que la synthèse de l'urée par les cellules du foie se fait sans intervention directe de la respiration, mais qu'elle est liée à la grandeur de l'intensité respiratoire. J. Brisou (1933), a montré que l'on peut de même arrêter chez les animaux adultes la fermentation lactique des tissus sans aucun trouble ; on peut donc généraliser à la cellule animale. Enfin une expérience de Haurowitz, (1927) complète la symétrie de la démonstration : de jeunes souris blanches, venant de naître, peuvent supporter sans inconvénient, une anaérobiose de plusieurs heures. La cellule animale jeune, ayant une intensité de fermentation lactique élevée, est donc une cellule anaérobie facultative, exactement comme la cellule de levure. La même démonstration avait été donnée par Wind et Negelein pour la cellule cancéreuse. (Otto Warburg, « Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs »).

L'arrêt de la fermentation laisse intactes, respiration et croissance cellulaire ; la réaction de Pasteur-Meyerhof subsiste également intacte ; si l'on substitue aux sucres des lactates comme aliment énergétique pour la cellule de levure, la croissance continue à se poursuivre normalement ; il est possible d'en déduire sans trop d'arbitraire que la cellule continue à pouvoir faire du glycogène aux dépens des lactates, le lactate représentant une forme de stabilisation du mé-

thylglyoxal, de valeur énergétique moindre que ce dernier corps, il est raisonnable de penser que le méthylglyoxal lui-même serait retransformé en glycogène en présence d'un inhibiteur de la fermentation. En d'autres termes, l'inhibition de la fermentation par les acides halogénés laisse substituer la réaction de PASTEUR-MEYERHOF, la synthèse en glucides des lactates tout au moins.

2. Observation vitale.

Avant de faire des mesures quantitatives de croissance il était nécessaire de s'orienter sur la nature du phénomène en utilisant la méthode de coloration vitale. Grâce à elle nous pouvons voir très rapidement si une cellule est bien vivante, si le corps étudié ne se comporte pas comme un corps toxique si la culture n'est pas contaminée par une bactérie aérobie, si enfin, au cours de la croissance nous retrouvions bien la cellule avec laquelle nous avions ensemencé le milieu et non un micoderme ou une levure non typique. Les colorants dits vitaux (bleu de méthylène, de crésyle, de Nil, rouge neutre) ont la propriété de pénétrer dans la cellule vivante et de colorer certaines enclaves du protoplasma. C'est PFEFFER, en 1886, qui a le premier remarqué que les vacuoles accumulent le bleu de méthylène, et prennent rapidement une coloration beaucoup plus intense que celle de la solution même, teinte qui disparaît lorsqu'on replace la cellule dans l'eau pure. Cette teinte est due à la coloration des granulations du cytoplasme et non à celle du cytoplasme lui-même.

Les recherches de GUILLIERMOND, ont démontré que la coloration des vacuoles est essentiellement vitale. La mort des cellules de levure devient un phénomène bien visible. Elle s'annonce par une coloration diffuse du protoplasme, puis par la décoloration et la contraction de la vacuole, la désorganisation de sa paroi ; à ce moment le protoplasme entier prend une teinte rouge foncé. GUILLIERMOND a cultivé les champignons les plus variés (Mucorinées, Oïdium lactis, Pénicillium glaucum, levure) sur une concentration de 2 mg. p. 100 de rouge neutre, les cultures ne diffèrent pas des cultures témoins et pendant tout leur développement présentent une superbe coloration des vacuoles. Au-dessus de 5 mg. p. 100 le développement se ralentit, mais les Champignons conti-

nuent à vivre jusqu'à 50 ou 60 mg. p. 100. Le bleu de Nil est beaucoup plus toxique, le bleu de méthylène l'est moins, mais c'est le rouge neutre qui présente la plus grande inocuité.

Aubel, Aubertin et Genevois ont démontré que les cellules de levure vivent dans des milieux additionnés de rouge neutre et alcalins, conditions dans lesquelles leurs vacuoles sont colorées ; l'intensité de respiration n'est pas augmentée par ces colorants. Genevois étudiant ce phénomène sur les cellules d'Algues Protococcacées trouve une augmentation d'intensité respiratoire par les colorants vitaux de rH supérieur à 8 (bleu de méthylène) de nature catalytique, et liée à l'accumulation du colorant à l'intérieur de la cellule.

Au cours des expériences décrites dans les chapitres précédents, il était facile, par la méthode des colorations vitales pratiquée à la fin de l'opération sur les témoins et sur les lots de cellules traitées, de se rendre compte des modifications morphologiques subies par les cellules traitées. A la fin de l'opération quelques gouttes de suspension de levure étaient mélangées d'une solution de phosphate disodique (pH 8) N/10 ; puis après mélange on ajoutait deux gouttes de rouge neutre à 4 0/00 ; si immédiatement après le mélange on observe les cellules, la coloration est d'abord douteuse ou indistincte ; puis, dans les 20 minutes qui suivent l'opération, on voit que des granulations rouges apparaissent dans la plupart des cellules, signe de l'intégrité de la structure de la cellule ; si la cellule prend dans son entier une coloration rouge ou orange, on peut la considérer comme morte ; si en effet, on mesure les constantes du métabolisme de cellules ainsi colorées, on trouve qu'elles sont pratiquement nulles, au moins pour la respiration. Le parallélisme entre l'observation morphologique et l'observation physiologique s'est révélé jusqu'ici assez bon. Toutefois, on pourrait évidemment imaginer des substances capables d'arrêter la fermentation et la respiration sans tuer les levures : un mélange de KCN d'acide bromacétique serait dans ce cas. C'est pourquoi il faut faire à l'observation morphologique la restriction suivante : si les cellules paraissent entièrement colorées, c'est qu'elles sont grossièrement altérées, et ont perdu toutes les propriétés de la vie ; si elles présentent la coloration vitale, elles doivent posséder, au moins en puissance, encore certaines des propriétés de la vie.

L'étude des cellules, après l'action des dérivés bromés soit

en aérobiose, soit en anaérobiose, a toujours montré des proportions de cellules vivantes du même ordre dans les récipients traitées et les récipients témoins ; tout cela, dans le cas des acides halogénés seuls, et des cétones halogénées. Les mélanges d'acide bromacétique et de cystéine, les esters d'acide halogénés, sont au contraire très toxiques : après une action de quelques heures en milieu étendu (N/4000) la plupart des cellules apparaissent comme tuées.

La non nocivité des dérivés bromés est apparue même au cours d'expériences de longue durée, où les cellules étaient conservées plusieurs jours au contact des acides halogénés. Toutefois, si les cellules sont en anaérobiose, une altération apparaît d'une façon sensible.

3. Culture des levures en fioles d'Erlenmeyer. Irréversibilité de l'arrêt de la fermentation après culture sur l'acide bromacétique.

Les premières expériences ont été faites en semi aérobiose dans les fioles d'Erlenmeyer contenant 50 cm³ de liquide, représentant une épaisseur d'un centimètre.

Le milieu contenait de l'acide acétique N/2 neutralisé à moitié et la solution phosphatée magnésienne, l'acide bromacétique était à la concentration de N/5000. Au bout de 5 jours, la levure était pesée dans les différents récipients. Trois milieux différents ont été préparés l'un à l'acétate seul, l'autre au saccharose, un troisième à l'alcool. Le milieu saccharosé était à 2 p. 100, le milieu à l'alcool contenait 23 g. par litre. Après 5 jours la croissance sur acétate était faible, sur alcool encore plus faible, sur saccharose seulement on notait un beau développement ; au microscope l'aspect des cellules sur acétate montrait 95 p. 100 des cellules vivantes, tandis que les cellules sur alcool étaient presque toutes tuées. En milieu saccharosé les cellules étaient bien entendu très vivantes et en pleine multiplication. En présence d'acide bromacétique la fermentation était nulle dans ces différents milieux, elle l'était encore, même après deux centrifugations. Ces levures, placées alors dans un milieu glucosé restèrent totalement inhibées, le phénomène a semblé ici irréversible ; ces levures totalement inhibées furent alors placées dans une solution de bleu de méthylène qui fut réduit avec une vitesse égale à celle

des levures témoins et en gardait leur intensité de fermentation. Le tableau XXXIII donne les développements de levure.

TABLEAU XXXIII.

Croissance de la levure Springer dans différents milieux en fioles d'ERLENMEYER.

Les chiffres sont des mg. de poids sec par litre.

	Témoins		ABr N/5000	
	0	4 jours	0	4 jours
Acétate.....	100	900	100	600
Acétate + alcool.....	100	400	100	300
Acétate + saccharose...	100	3.500	100	3.300

La levure ayant poussé sans fermentation, en présence d'acide bromacétique, a bel et bien perdu, au moins dans l'instant présent, toute possibilité de fermentation. En effet, cette levure centrifugée, puis replacée en solution sucrée, ne peut plus faire fermenter le sucre. Tableau XXXIV. Il y a donc inhibition irréversible de la fermentation.

TABLEAU XXXIV.

Irréversibilité de l'action de l'acide monobromacétique après culture sur la levure Springer.

	I O_2	F CO_2	I O_2	F CO_2	I O_2	F CO_2
	Témoins		+ Abr N/2500		+ ABr N/5000	
Après 2 centrifugations..	27	212	21 23	0 0	19 20	0 0
Après séjour de 8 heures en milieu saccharosé PO^4			20	0	16	0
Après culture de 3 jours en milieu saccharosé eau de levure			31	172	28	177

Cette inhibition est-elle définitive pour la race de cellule ? Il n'en est rien : il est possible de repiquer les cellules traitées par l'acide bromacétique sur fioles d'ERLENMEYER, en semi-aérobiose, sans acide bromacétique : la croissance continue normalement. Si, lorsque les cellules sont multipliées 20 ou 30 fois, on mesure à nouveau, les constantes du métabolisme, on les trouve à peu près égales à ce qu'elles étaient avant l'expérience, ou à ce qu'elles sont chez les témoins qui n'ont jamais subi l'action de l'acide bromacétique. En d'autres termes, la race, qui avait momentanément perdu la possibilité de fermenter, retrouve cette possibilité lorsqu'elle est placée dans un milieu convenable. La cellule s'adapte à chaque instant aux possibilités de réactifs chimiques qui lui sont offertes.

Il importe essentiellement, d'insister sur ces deux faits : la cellule qui s'est développée en présence d'acide bromacétique a réellement perdu sa fermentation, mais elle peut la retrouver si on la cultive de nouveau sans acide bromacétique. On a objecté en effet, à ces expériences sur l'acide bromacétique, que l'inhibition n'était qu'apparente et que la cellule gardait encore en son intérieur, pour ses besoins personnels si je puis dire, une certaine fermentation. L'expérience de centrifugation permet sans ambiguité, de répondre à cette objection ; s'il y avait seulement dissimulation de la fermentation, elle réapparaîtrait sans aucun doute au moins d'une façon partielle, lorsqu'on élimine complètement du milieu l'acide bromacétique très soluble.

D'autre part, la culture ultérieure des cellules sur milieu sucré démontre qu'il s'agit d'un phénomène présenté par les cellules réellement vivantes, et non pas des cellules en survie. La cellule a gardé la possibilité virtuelle de construire les ferments nécessaires à la fermentation alcoolique, et dès qu'on lui permet de fermenter, elle se remet à construire du ferment, et au bout de 5 à 6 générations, elle a retrouvé son équilibre initial. Des expériences analogues ont été publiées antérieurement au sujet de la saccharase par exemple.

4. Cultures en courant d'air en présence d'ABr.

Les expériences sur fioles d'ERLENMEYER présentaient un inconvénient grave : l'aérobiose n'était pas parfaite ; le développement des levures était relativement faible. Il a paru

indispensable de reprendre cette expérience en plaçant les levures dans un courant d'air, de manière à assurer non seulement la saturation d'oxygène dans le milieu, mais encore une répartition homogène des cellules dans la totalité du volume. Dans ces conditions, la vitesse de croissance est beaucoup plus rapide. L'expérience est donc infiniment plus démonstrative, puisque l'on utilise le maximum des capacités de synthèse de la levure. Il était indispensable d'autre part d'étudier divers milieux, plus ou moins riches en matières azotées, en facteur de croissance ; c'est ainsi que, successivement, l'eau de levure, une décoction de raisins secs, le moût de bière, le jus de cerises stérilisé ont été employés avec un égal succès. Autolysat de levure et moût de bière sont très riches en matières azotées ; jus de cerise et décoction de raisin sont très pauvres au contraire en azote ; le phénomène se passe de même façon cependant dans tous ces milieux.

Il importait d'autre part de répéter l'expérience sur des levures diverses : levure de vin, levure haute typique. Je dois à l'obligeance de M. Guilliermond, par l'entremise de M. Genevois, diverses espèces de levures qui sont des types classiques des collections de microorganismes. Ces diverses levures se comportent de la même façon que les autres.

TECHNIQUE.

Des fioles coniques, tubulées, de contenance totale 500 cm^3 étaient remplies de 250 cm^3 de liquide, sur une hauteur de 4 cm ; l'aération était complète par un énergique brassage du liquide. Ces fioles étaient d'un côté en relation avec un tube collecteur relié à une trompe à vide qui permettait d'utiliser de 6 à 8 récipients à la même expérience, de l'autre côté, à des fioles de même type, contenant une solution N/100 en SO^4H^2 à laquelle on avait ajouté quelques gouttes de bichromate de potassium et possédant un gros filtre de coton à leur extrémité.L'air était ainsi filtré sur coton, puis lavé dans une solution chromo-sulfurique très étendue. Il était indispensable en effet, que l'air traversant les milieux de culture, soit exempt de tout germe et de toute souillure pour ne pas les contaminer. De plus, chaque fiole, après introduction du milieu nutritif est stérilisée. Après stérilisation, l'acide broma-

cétique était ajouté et l'ensemencement était fait avec toutes les précautions d'aseptie nécessaires. Le temps des cultures n'excédait jamais 48 heures, en effet, au bout de ce temps là, la croissance se ralentit beaucoup. Après 48 heures nous prenions un volume connu : 50 cm³, après centrifugation et lavage à l'eau, répétée deux fois pour enlever toute trace de sucre, le culot était placé dans une étuve, à 90°. Après pesée, le poids sec était toujours rapporté en mg. par litre.

Nos milieux contenaient toujours 10 p. 100 de saccharose et une solution de sels minéraux ainsi conçue :

$SO^4(NH^4)^2$.....	100 gr.
PO^4KH^2	60 gr.
PO^4Na^2.....	20 gr.
H^2O q. s.....	1.000 cm³.
$SO^4Mg^7H^2O$.....	28 gr.
H^2O q. s.....	1.000 cm³

Les deux solutions étaient faites séparément, pour éviter la précipitation du phosphate ammoniaco magnésien, nous prenions 40 cm³ de la première et 20 cm³ de la seconde pour 1000.

L'eau de levure employée était un autolysat de levure. On laissait de la levure s'autolyser 24 heures dans 3 fois son poids d'eau sous une couche de toluène à 35°, ou 48 heures à 22° ; au bout de ce temps on décantait, on portait 3 heures à 80° puis on filtrait, on obtenait un liquide limpide jaune d'or. Le moût de bière était préparé à partir de malt qu'on laissait digérer dans 5 fois son poids d'eau à l'étuve à 55° pendant 3 jours : on filtrait. Le jus de raisin était préparé à partir de raisins secs, on passait au hachoir, puis mélangeait à 5 fois son poids d'eau, on portait 3 heures à 80° puis on filtrait. Ces différentes solutions étaient employées à 5 p. 100 pour l'eau de levure, à 10 p. 100 pour les autres.

Le tableau XXXV permet de comparer les quelques levures de vin (Levure Coutet 2,4) et une levure haute (L. D. 15) dans divers milieux. Après chaque expérience, on mesurait le poids sec des cellules présentes dans le milieu et autant que possible les intensités de fermentation et de respiration. Il est visible que la masse de levure qui se forme tend vers une limite, indépendante de la quantité ensemencée. Avec un ensemencement très faible, de 6 à 10 mg. par litre, on arrive à 40 ou 50

fois son poids ; si l'on introduit 30 mg. environ, la masse est multipliée par 20 à 30 ; si l'on introduit 100 mg., la masse de levure est multipliée par 8 à 10. La quantité totale de levure qui s'accumule dans le milieu est de l'ordre du g. sec par litre. Les recherches des auteurs anglais ont montré que la vitesse de croissance de la levure diminue énormément lorsque croît la concentration en alcool. C'est peut être ce fait qui limite la concentration en levure à un taux assez modeste.

D'autre part d'une levure à l'autre, on observe des différences systématiques : la levure 15 est une levure robuste, qui atteint facilement la concentration du g. par litre, tandis que la levure 4, levure de vin blanc à croissance très lente, n'a jamais atteint 400 mg. par litre ; la levure 2, levure de vin rouge, est intermédiaire entre les deux ; la levure du Château Coutet, levure typique de vin blanc arrive assez facilement au g. par litre. A la fin des diverses expériences, la mesure de l'intensité de fermentation permettait de vérifier que l'inhibition était réelle ; aux faibles concentrations N/10.000 pa rexemple elle n'est toujours que partielle ; pour une concentration N/5000 elle est tantôt complète, tantôt de l'ordre de 50 p. 100 ; pour une concentration de N/2500 elle est toujours complète. Le tableau XXXV permet de se rendre compte que dans les conditions où l'inhibition est complète, la vitesse de croissance de la levure n'est pas identique à la vitesse de croissance en l'absence d'acide bromacétique : les différences vont de 20 à 30 p. 100. L'acide bromacétique est un agent trop actif, son affinité pour les matières azotées est trop grande, pour qu'il soit complètement inactif. Toutefois on reconnaîtra que la croissance est encore très importante, et comme ordre de grandeur tout à fait comparable à la croissance sur milieu normal. Il importe de remarquer que l'expérience est conduite de manière à rendre maxima l'action de l'acide bromacétique : la vitesse de croissance est maxima, la durée au bout de laquelle les mesures sont faites, est telle que la croissance n'est pas encore annulée mais qu'elle continue encore un peu. Le tableau XXXV montre en effet qu'une certaine croissance subsiste encore du 2e au 3e jour. Le tableau XXXVI donne une expérience où l'on a dosé la levure dans le même milieu à divers intervalles de temps.

Le tableau XXXVIII est tout entier relatif à des cultures faites avec la levure de boulanger Springer, avec des concentrations diverses en acide bromacétique, et des concentrations ini-

tiales différentes en levure. Le milieu employé était dans tous les cas une solution de saccharose à 10 p. 100 additionnée de phosphate acide de potasse et d'eau de levure (pH 5). La fermentation était contrôlée à la fin de l'expérience d'une manière qualitative, en plaçant les levures dans une solution de saccharose, dans un tube d'EINHORN. Des contrôles à la fin de chaque expérience ont permis de montrer qu'il y avait encore un grand excès de sucre dans le milieu à la fin de l'expérience : des 100 g. de sucre existant dans le milieu au début, la moitié au plus était détruite par la croissance et la respiration des cellules. Cette expérience sur la levure de boulanger montre que l'on obtient régulièrement les 3/4 de la masse des cellules du témoin en présence d'une concentration en acide bromacétique suffisante pour arrêter complètement toute fermentation. Ce résultat est acquis lorsque la masse initiale d'ensemencement varie de 40 à 280 mg. par litre.

Ces expériences montrent que la culture des levures en présence d'acide monobromacétique constitue une expérience très facile à reproduire, donnant des résultats très constants, dans des conditions qui sont parfaitement normales pour la croissance des levures, avec des milieux très faciles à préparer. Dans toutes ces expériences la température a été celle de la salle où était placé le montage, très voisine de 18°.

Le tableau XXXVII permet de comparer 3 levures envoyées obligeamment par M. GUILLIERMOND : Saccharomyces Pasteurianus, Saccharomyces Mangini, Willia Saturnus ; ces trois levures sont bien différentes. S. Pasteurianus a été isolée de la bière ; c'est une levure sauvage causant des altérations graves dans les brasseries, surtout dans le nord de l'Europe. S. Mangini, est au contraire une levure africaine, rapportée par la Mission Chevalier, d'Afrique Occidentale. Enfin la Willia, Saturnus, décrite par KLÖCKER a été isolée dans la terre d'Italie et du Danemarck. Malgré ces diversités d'origines, ces trois levures se comportent de même façon, et de même façon que la levure de boulangerie ; l'acide bromacétique à la concentration N/5000 arrête d'une façon complète toute espèce de fermentation, et fait varier la masse de cellules formées en moyenne de 10 p. 100. Cette expérience démontre donc, au moins dans le groupe des levures, la possibilité générale pour la cellule de croître sans fermentation.

TABLEAU XXXV.

Culture des levures en présence d'acide bromacétique en courant d'air.

(Les chiffres sont des mg. de poids sec par litre).
Température 18°.

Dates	Levure	Milieu	Concentration en ABr	Nombres de croissance		$\frac{I}{O^2}$	$\frac{CO^2}{F\ CO^2}$
				0	48 heures		
24-3-31	Coutet	saccharose	0	34	620	38	122
			N/5000	34	570	32	0
		+ eau de levure	0	34	950	42	212
			N/5000	34	860	36	0
		+ jus de raisin	0	34	1300		
			N/5000	34	700		
20-4-31	Lev. L. D. 15	moût de bière	0	100	920	19	197
			N/10000	100	1240		
			N/5000	100	840	18	0
			N/2500	100	800	13	0
9-5-31	Levure 2	eau de levure	0	10	560	47	145
			N/10000	10	460	56	59
			N/5000	10	420	31	17
	Levure 4	eau de levure	0	6	240	50	88
			N/10000	6	200	40	53
			N/5000	6	180	50	60
			N/2500	6	160	40	0
8-4-31	Levure 4	moût de bière	0	96	380		90
			N/5000	96	250		0
6-4-31	Levure 15	eau de cerise	0	90	820	32	210
			N/5000	90	700	26	0

TABLEAU XXXVI.

Croissance des levures en fonction du temps en courant d'air.

Cultures (suite) (Collection Guilliermond).

	0	48 h.	72 h.	96 h.
Levure 26	10	2140	2480	3000
— + Abr N/5000.	10	1600	2060	2200
Levure 28	15	1960	2600	3320
— + ABr N/5000.	15	1640	2260	2760

TABLEAU XXXVII.

Cultures (suite) (Collection Guilliermond).

Dates	Levures	Milieu	Concentration en ABr	Temps de croissance		Fermentation (Einhorn)
				0	48 h.	
22-10-33	Saccharomyces pasteurianus	eau levure	0	120	1050	total
			N/5.000	120	900	0
25-12-33	Saccharomyces pasteurianus	eau levure	0	50	1500	total
			N/5 000	50	1100	0
17-12-33	Saccharomyces Mangini	eau levure	0	19	710	total
			N/5.000	19	580	0
21-12-33	Saccharomyces Mangini	eau levure	0	60	1000	total
			N/5.000	60	860	0
21-12-33	Willia Saturnus	eau levure	0	100	1200	total
			N/5.000	100	1100	0

TABLEAU XXXVIII.

Cultures (suite). (Levure de boulanger Springer).

Dates	Milieu	Concentration en ABr	Temps de croissance		Fermentation (Einhorn)
			0	48 h.	
30 11-32	eau de levure	0	150	1500	total
		N/7500	150	1150	30 p. 100
		N/5000	150	960	0
24-12-32	eau de levure	0	180	1900	total
		N/5000	180	1500	0
14-12-33	eau de levure	0	40	880	total
		N/5000	40	650	0

5. Culture des levures sur lactate en présence d'acide bromacétique.

La levure peut croître aussi bien en présence de lactate, qu'elle ne peut naturellement pas faire fermenter, qu'en présence de saccharose. L'étude de ce fait, a été fait avec soin, car il démontre par deux fois que la croissance de la cellule de levure, peut se faire indépendamment de toute fermentation cellulaire :

1° les rendements en poids de levure en présence de lactate sont égaux ou supérieurs aux rendements obtenus en présence de saccharose en milieu aérobie.

2° les rendements en présence de saccharose et d'acide bromacétique ou de lactate et d'acide bromacétique, sont du même ordre que les rendements précédents.

La synthèse des matériaux nécessaires à la cellule se faisait par conséquent avec la même vitesse aux dépens du saccharose, et cela même lorsque toute fermentation est impossible, ainsi que les paragraphes précédents l'ont montré.

Les expériences faites pour cette démonstration se rattachent aux deux types précédemment décrits : expériences sur fioles d'Erlenmeyer, en semi-anaérobiose, expériences sur fioles tubulées en courant d'air en aérobiose parfaite. Le

TABLEAU XXXIX.

*Culture sur lactate et saccharose en fioles d'*ERLENMEYER.

	0 jour	4 jours	6 jours
Saccharose	100	2500	3500
— + ABr N/5000	100	2300	3200
— + ABr N/2500	100	2600	3100
Lactose seul	100	3400	3800
— + ABr N/5000	100	3300	3700
— + Abr N/2500	100	3200	3600

TABLEAU XL.

Cultures avec ou sans lactate.

Dates	Levures	Milieu	Concentration en ABr	Temps de croissance		$\frac{I}{O^2}$	$\frac{CO^2}{F\ CO^2}$
				0 jour	3 jours		
3-12-31	Coutet	Saccharose	0	100	2500	48	160
			N/4000	100	2400	42	0
		Lactale	0	100	2500	56	0
			N/4000	100	2300	54	0
15-4-31	Lev. L. D. 15	Saccharose	0	58	920		148
			N/5000	58	860		0
		Lactate	0	58	980		0
			N/5000	58	700		0
15-5-31	Levure 4	Lactate	0	30	156	108	0
			N/5000	30	152	76	0
			N/2500	30	122	85	0
24-12-32	Springer	Saccharose	0	18	1900		190
			N/5000	18	1500		0
		Lactate	0	18	1000		0

tableau XXXIX reproduit les résultats des expériences faites sur fioles d'Erlenmeyer. Le tableau XL reproduit les résultats obtenus par la méthode du courant d'air, avec le contrôle des intensités de fermentation. Ces expériences ont été répétées avec le même succès avec diverses levures de caractères différents. Les concentrations agissantes sont toujours les mêmes et vont de 2/2500 à N/4000 en acide bromacétique.

6. Indépendance de la croissance et de la fermentation.

La croissance des cellules de levures, même des levures typiques à forte intensité de fermentation, peut se faire entièrement aux dépens de la respiration, sans aucune intervention de la fermentation. Les expériences qui conduisent à ce résultat sont de deux ordres ; elles sont également rigoureuses au point de vue des conditions de milieu, et au point de vue des résultats quantitatifs qu'elles permettent d'obtenir avec une grande régularité et avec des espèces de levures très variées.

1° La croissance est quantitativement du même ordre sur milieu sucré aérobie, avec acide bromacétique en quantité suffisante pour arrêter d'une façon totale, et irréversible au point de vue de l'individu cellulaire, de la fermentation, cela en comparaison avec les milieux normaux.

2° La croissance est rigoureusement la même en présence de lactate et en présence de sucre ; elle est du même ordre en présence de lactate et d'acide bromacétique, qu'en présence de sucre et d'acide bromacétique.

Il est possible de conclure de ces expériences, que la croissance est indépendante de la fermentation, et que la réaction de Pasteur-Meyerhof, réaction de synthèse des glucides en milieu aérobie, n'est pas arrêtée par les concentrations en acide bromacétique qui arrêtent la fermentation.

CHAPITRE VI.

COMBINAISON ENTRE LA LEVURE ET LES DÉRIVÉS HALOGÉNÉS.

1. Fixation de l'acide bromacétique par la levure.

Une étude complète de l'action des dérivés bromés sur les cellules de levure doit s'efforcer de mettre en évidence une combinaison de ces corps avec la matière vivante. Les considérations exposées au premier chapitre ont montré que les dérivés bromés se combinent avec une extrême facilité à froid aux dérivés azotés tels que les amines, et cela avec une vitesse indépendante du poids moléculaire des amines. Il était donc vraisemblable qu'une certaine proportion de dérivés bromés fut combinée à la masse de la levure.

La mise en évidence expérimentale de cette combinaison est un peu délicate. Cette combinaison en effet, ne peut qu'être partielle. D'autre part, pour que l'étude ait un sens, il faut faire les mesures dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire en se rapprochant autant que possible des conditions de dilution correspondant aux mesures d'inhibition.

Il n'est pas possible toutefois, de respecter complètement ces conditions : aux grandes dilutions, les dosages des corps halogénés sont trop peu sensibles pour que l'on puisse les utiliser avec une chance raisonnable de trouver des résultats ayant un sens.

Les premières mesures ont montré qu'avec une faible proportion de levure, les résultats obtenus étaient peu nets. Voici une technique expérimentale qui donne des résultats relativement satisfaisants. On prend une suspension contenant 10 g. de levure fraîche dans 100 cm³ ; on ajoute à cette suspension l'acide bromacétique de manière à mener la concentration dans cet acide à des valeurs qui sont N/50, N/100 et N/200. Un témoin est fait pour chaque concentration d'une

part sans levure, d'autre part avec des levures tuées, par le froid autant que possible. La levure restait pendant 12 heures au contact de la solution d'acide, ce laps de temps a été jugé nécessaire pour permettre à l'acide de pénétrer à l'intérieur des cellules. L'équilibre établi, la levure était centrifugée. Le dosage du brome libre était fait dans la solution, avant et après hydrolyse de l'acide bromacétique par la soude décinormale à l'ébullition. Le brome apparaissant dans cette hydrolyse à chaud donnait la concentration en acide halogéné de la liqueur. Le brome était dosé par le nitrate d'argent en milieu presque neutre ; le chiffre obtenu étant la différence de deux dosages, l'un fait à froid directement, l'autre fait après ébullition en milieu alcalin, les acides organiques préexistant dans le milieu ne pouvaient influencer le dosage ; en admettant toutefois que leur constitution ne soit pas changée par action de l'alcali.

Le tableau XLI groupe l'ensemble des expériences faites avec des concentrations variées en acide bromacétique. Il apparait immédiatement, que la quantité d'acide fixé croît avec la concentration, pour tendre ensuite vers une limite à peu près indépendante de la concentration. Cette limite est de l'ordre de 6/100 de molécule par kg. frais de levure, c'est-à-dire environ 0,2 molécule par kg. sec. Cette quantité est élevée ; elle correspond certainement à une dénaturation des protéines de la cellule de levure : un kg. sec de levure contient 4 à 5 atomes d'azote combinés, la plus grande partie sous forme de nucléines ou de liaisons peptidiques. Les groupements NH^2 libres sont certainement en petite quantité. Des expériences faites par L. Genevois et T. Nicolaieff, ont cherché à mettre en évidence la réaction du formol sur les acides aminés et sur la cellule de levure. Il a pu être montré ainsi que la quantité de formol qui se combine à un kg. sec de levure, correspond à environ 1 molécule. Mais l'action du formol, qui était employé en solution décinormale, était naturellement beaucoup plus énergique que celle de l'acide bromacétique. Si la différence des quantités fixées n'est pas négligeable, de l'ordre de 200 millimolécules par kg sec pour l'acide halogéné, de l'ordre de 300 à 400 millimolécules pour le formol, on reconnaîtra cependant une très remarquable coïncidence quant à l'ordre de grandeur du phénomène dans les deux cas. La différence s'explique d'ailleurs fort bien par le fait que l'acide bromacétique réagit d'une manière incomplète ; si en effet on

remplace l'acide bromacétique par le bromacétate d'éthylglycol, la quantité combinée aux cellules de levure augmente notablement et devient identique à la quantité de formol qui se combine aux levures.

Si remarquable que soit cette expérience, au point de vue de la structure et des propriétés chimiques de la cellule vivante elle est cependant à peu près sans intérêt pour expliquer l'inhibition de la fermentation. En effet, la proportion d'acide bromacétique fixé par rapport à la quantité d'acide bromacétique présente dans la liqueur, décroît lorsque décroît la concentration en acide bromacétique. Cette proportion fixée est en moyenne de 70 p. 100 en solution N/100, de 50 p. 100 en solution N/200, tombe au-dessous de 25 p. 100 en solution N/400. Par conséquent aux dilutions physiologiques de N/2000, la quantité d'acide bromacétique fixé doit être très faible ; peut être que la fixation est labile, et se trouve déjà détruite par la centrifugation. Cette expérience semble un argument de plus pour penser que l'acide bromacétique a sur la levure une action essentiellement superficielle. Les dosages de brome dans la levure vont confirmer cette notion.

TABLEAU XLI.

Fixation de l'acide monobromacétique par de la levure Springer. Suspension de levure à 10 p. 100 de levure fraîche dans des solutions de concentrations variées en acide bromacétique. Les chiffres indiqués sont la quantité d'acide bromacétique fixé par g. frais de levure, en cent millièmes de molécule.

Dates	Concentration en ABr			
	N/50	N/100	N/200	N/400
24-3-31			2,2	
4-4-31		6,7	2,3	0,6
1-4-31		6,9	2,0	0,3
23-4-31	8,6	7,6		
24-4-31	5,6	6,0	3,1	

2. Dosage du brome dans la levure et dans les liquides de fermentation.

Au lieu de chercher à doser l'acide bromacétique, dosage toujours un peu délicat, il était possible de doser le brome brutalement, d'une part dans la liqueur sucrée, d'autre part dans les levures. Le dosage se fait dans les cendres après calcination ; il a l'immense avantage de pouvoir se faire dans les conditions physiologiques ; il suffira à nous révéler si le brome est fixé ou non par les cellules vivantes.

Le dosage du brome en milieu minéral peut se faire en milieu extrêmement étendu, d'une façon très spécifique par l'élégante méthode donnée par M. Labat. Quelques dosages ont été faits dans ces conditions sur des milieux fermentescibles contenant des levures, et ayant reçu de faibles quantités d'acide bromacétique. L'expérience a montré que le brome se trouvait à la fin de l'expérience, dans la solution et non dans les levures. Les levures avaient été séparées du milieu organique par centrifugation.

TABLEAU XLII.

Fixation par la levure de l'acide bromacétique et du bromacétate d'éthylglycol.

Contact : 18 heures en anaérobiose. Concentration en dérivés halogénés en cent millièmes de molécule par litre. Les quantités fixées sont rapportées à 1 g. de levure fraîche.

	Acide bromacétique		Bromacétate d'éthylglycol	
	Concentration	Différence	Concentration	Différence
Solution témoin.....	13,8	5,0	15	9,8
— + levure 10 p. 100.	8,8		5,5	
— témoin.....	10,5	2,1	9,2	3,8
— + levure 10 p. 100.	7,4		5,4	

3. Bromacétate d'étylglycol et levure.

Les bromacétates organiques ont sur les levures une action bien plus considérable que l'acide bromacétique. Sans doute est-ce dû à la propriété qu'ont ces corps d'être solubles dans les graisses. La comparaison entre la fixation d'acide bromacétique et celle du bromacétate d'éthylglycol a été faite dans deux expériences rapportées sur le tableau XLII. Le bromacétate organique se concentre dans la levure environ 2 fois plus que l'acide. Le nombre de molécules fixées par kg. sec de levure s'élève à 0,4 environ, c'est-à-dire du même ordre que la quantité de molécules de formol fixées. Ici encore, l'expérience a été faite dans des solutions relativement concentrées, de l'ordre de N/100, dans des conditions où les levures ont été tuées.

CONCLUSIONS.

Ce travail a été orienté dans deux directions différentes :

1° D'un point de vue physico-chimique ; recherche du déterminisme de la fermentation et de la croissance par les dérivés halogénés.

7° D'un point de vue physiologique ; chercher à montrer que la croissance peut se faire indépendamment de toute fermentation dans le cas des cellules de levures.

La première de ces études a conduit à examiner les propriétés, de plus de 50 dérivés halogénés, dont nous connaissons aujourd'hui l'action sur la fermentation, la respiration et la croissance des cellules de levure. Un certain nombre de ces corps étaient nouveaux, et n'avaient jamais encore été décrits en chimie organique. La conclusion de cette étude pharmacologique est très simple : la fonction inhibitrice sur la fermentation est la fonction $CH^2X\ CO^2\ R$, X étant Br ou I ; en milieu acide, à un pH inférieur à 5, l'inhibition est exactement la même, qu'il s'agisse d'un bromacétate ou d'un iodacétate ou d'un ester organique de ces deux acides. En milieu neutre, bromacétates et iodacétates minéraux deviennent beaucoup moins actifs tandis que les bromacétates organiques conservent leur action inhibitrice sur la fermentation.

En milieu acide, les bromacétates organiques non seulement arrêtent la fermentation, mais encore arrêtent la respiration et la multiplication des cellules, ce qui peut se traduire en disant que les bromacétates organiques tuent les cellules. En milieu neutre, cette action toxique disparaît, et il subsiste une action spécifique sur la fermentation. Un fait remarquable qu'a révélé cette étude, est que l'action des bromacétates organiques est, dans tous les cas, indépendante du radical alcoolique, que ce radical ait 1 ou 8 atomes de carbone, qu'il soit un alcool aliphatique, un alcool cyclique, un poly-alcool, ou un éther-oxyde. Dans tous les cas, la spécificité du grou-

pement chimique CH^2XCO^2 apparaît, avec une netteté dont on ne connaissait pas encore beaucoup d'exemples en pharmacologie.

Si on emprisonne le groupement actif en passant à des corps de formule $R'CHXCO^2R$, on arrive à des dérivés beaucoup moins actif, d'autant moins actifs que R' a un poids moléculaire plus élevé. Déjà lorsque R' est CH^3, l'activité est divisée par 5 ; lorsque R' est le radical isopropyle l'activité est divisée par 100. Si le groupement CH^2XCO^2 est bloqué par l'hexaméthylènetétramine, l'activité physiologique tombe également à 0. Cétones et aldéhydes halogénées ont une action non sans analogie avec celle des corps précédents, mais néanmoins, assez distincte.

La seconde étude, proprement physiologique, tend à nous représenter sous un jour différent les relations entre les réactions productrices d'énergie et la croissance cellulaire. Chez une levure typique, capable de se développer aux dépens de la fermentation, on peut bloquer complètement la fermentation, et l'amener à croître aux dépens de la respiration, avec une vitesse très semblable à celles que présentent les témoins à qui l'on n'interdit point de fermenter tout en respirant. La croissance persiste numériquement avec la même vitesse si l'on substitue au sucre un lactate. La cellule peut donc faire ces synthèses tout aussi facilement aux dépens de la seule respiration qu'aux dépens de la fermentation. Des recherches à l'heure actuelle en cours, publiées sous forme de notes préliminaires, semblent montrer qu'il s'agit là d'une propriété tout à fait générale de la cellule vivante, que l'on retrouve chez les Graminées, ou les cellules des animaux supérieurs.

La cellule emprunte aux réactions productrices d'énergie, uniquement l'énergie qu'elles fournissent, et l'utilise de son mieux pour les synthèses dont elle a besoin. La nature même de ces réactions productrices d'énergie lui importe assez peu. C'est ainsi que dans le muscle empoisonné par l'acide bromacétique, la contraction se fait aux dépens de l'hydrolyse de l'acide créatinephosphorique. De pareilles substitutions d'une reaction productrice d'énergie à une autre, semblent la règle dans le monde vivant, et témoignent de l'extraordinaire souplesse du mécanisme de la vie.

BIBLIOGRAPHIE.

J. C. ANDREWS. — Racemisation et décomposition de la cystine en solution acide. *Journ. biol. chemistry*, **97**, proc. XIX, 1932.

Dr JULIUS ALTPETER. — Dos Hexamethylentetramin und reine Verwendung. Knapp, Halle, 1931.

AUBEL, AUBERTIN et GENEVOIS. — Sur le potentiel d'oxydo réduction de la levure, des anaerobies facultatifs, des anaerobies stricts et des milieux où vivent ces microorganismes. *Chem. physiol. et physiochim biol.*, **5**, 1-10, 1919.

AUBEL et GENEVOIS. — Sur la valeur du potentiel d'oxydo réduction des cellules de levures. *Ann. Brass.*, **27**, 87, 1928.

H. J. BAKER et W. H. VAN MELS. — Geschwrindigkeit der Reaktion Zwischen Halogencarbonsaüren und Sulfiten. *Trav. Chim. Pays-Bas*, **49**, 177, 94, 15-2, 1930.

H. K. BARRENSCHEEN et Karl BRAUN. — Untersuchungen über die glycolyse des Blutes, *Biochemische Zeitschrift*, **231**, 144-172, 1930.

H. K. BARRENSCHEN, Karl BRAUN, Micklos DIEGUN. — Glykolyse hemmung und Methylglyoxalanhaüfung. *Ibid.* **252**, 165-180, 1930.

J. V. BRAUN, O. BAYER, LEBERECHT CASSEL. — Die relative Bildungsleicheichkeit von Ringen I. *Ber. D. Chem. Ger.* **60**, 2602, 1927.

J. BRISOU. — Absence de toxicité des mélanges d'acides halogénés en injection sous cutanée. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1390, 1933.

J. BRISOU. — Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation lactique des tissus normaux et cancéreux, *in vitro* et *in vivo*. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1391, 1933.

H. W. CASSEL. — Die spaltung von chlor und bromessigsäure in alkoholischer Losung *Zeit Physik. Ch.*, t. **92**, p. 113-126, 11, 1916.

CAYROL et GENEVOIS. — Inhibition spécifique de la fermentation alcoolique des cellules de levure sans arrêt ni de la respiration ni de la réaction de PASTEUR-MEYERHOF ni de la croissance. *C. R.*, **192**, 1931, 1494.

CAYROL. — Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation alcoolique. *C. R.* **193**, 446, 1931.

CHAPHEAU. — Recherches sur le métabolisme cellulaire de quelques invertébrés marins. Thèse Bordeaux 1932. *C. R. Soc. Biol* **110**, 970, 1932.

HANS TRACHER CLARCK. — The relation between Reactivity and chemical constitution of certain halogen compounds. *Chem. Soc.*, **97**, 1, 416, 1910.

M. T. Clarcke. — Action du sulfite sur la cystéine. *Journ. biol. chem.*, **97**, 235, 1932.

C. R. Clemo, W. H. Perkin et R. Robinson. — Strychnine and brucine. *Chem. Soc.*, **125**, 1751, 9, 1924.

M. Cozic. — Inhibition de la croissance et de la respiration de *Bacterium Xylinum* par divers dérivés halogénés. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1387, 1933.

H. N. Dawson et W. Lowson. — Acid and Salt effects in catalysed réactions. The catalytic activity of cloracétic acid in the hydrolysis of éthylacétate. *Chem. Soc.*, **3**, 393, 1929.

Denigès, Chelle et Labat. — Précis de chimie analytique, Paris Maloine, 1930.

J. Dexter, H. Mc Combie et H. A. Scarborough. — Ethylbromacétate und pyridin *Chem. Soc.*, **123**, 1229, 1923.

W. A. Drushell et G. H. Simpson. — The relative stability of halogen substituted aliphatic acid in water solution. *Am. Chem. Soc.*, **39**, 2453, 11, 1917.

Einhorn et Ladisch Mauermayer. — Ueber die N. Methylolverbindungen der Saureamide N. Methylolverbindungen der Amide ciniger Halogen fettsaüren. *Lieb. Ann.*, **343**, 279, 1905.

Arnold H. Eggerth. — Die keimtôtende Wunkung von α mercapto und Disulfosaüden. *Journ. exp. Med.*, **53**, 26-36, 1931.

Eichloff. — Uber halogenierte essigsaüeren. *Liebigs Annalen*, **342**, 115, 1905.

H. Euler. — Ueber die Reaction Zwischen Sillernitrat und organischen Halogen-Verbindungen. *Ber. d. D. Ch. G.* **39**, 2726, 29, 9, 1906.

R. Fabre et H. Simonnet. — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo réduction. Recherches sur la levure de bière, influence de la dessiccation. *C. R. Ac. Sc.*, **192**, 852, 1931. Recherches sur la levure de bière. Conditions expérimentales de son action sur la cystine *C. R. Ac. Sc.*, **191**, 1075, 1930.

Euler et Cassel. — Uber die spaltung von Chloressigsaure. *Phys. Chem.*, **84**, 371, 191.

Fourneau. — Action des ethers de l'acide phenylbromacétique sur les amino alcools. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 4, III, 406, I, 1908.

P. Genaud. — Sur les échanges d'ions entre cellules de levure et solutions de NH^4Cl. *C. R. Ac. Sc.* **188**, 1513, 1929. Sur les échanges d'ions entre cellules de levure et solutions de $(NO^3)^2Pb$ *C. R.* **189**, 591, 1929. Recherches sur les échanges d'ions entre cellules de levure et solutions salines. *Ann. Physiol et physiochim. biol.*, 6, 1930 et Thèse Paris, 1930.

L. Genevois. — Sur la respiration et la fermentation chez les Végétaux chlorophylliens. *Rev. Gen. de Botanique*, **40**, 53, 1928.

L. Genevois. — Coloration vitale et respiration. Protoplasma. **5**, 67, 1928.

L. Genevois. — Sur la respiration et la fermentation dans les tissus du pois. *C. R. Acad. Sciences*, **188**, 1338, 1929.

L. Genevois. — Métabolisme et fonction des cellules. Paris, Masson, 1831.

L. Genevois et Brisou. — Recherches sur la présence du facteur Z dans le jus de raisins et les liquides fermentés. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 865, 1931.

L. Genevois et Brisou. — Absence de toxicité des mélanges d'acides halogénés et de leur esters par voie buccale, *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1389, 1933.

L. Genevois, Cayrol et T. Nicolaieff. — Action de divers dérivés halogénés sur la cellule de champignons inférieurs. *C. R. Soc. biol.*, **112**, 1382, 1933.

L. Genevois et A. Kirrmann. — Action des aldéhydes et des cétones bromés sur la cellule de levure. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1383, 1931.

L. Genevois et Cayrol. — Action de la cystéine sur la fermentation alcoolique en présence du facteur Z ou d'acide acétique halogéné. *C. R. Soc. Biol*, **111**, 180, 1932.

L. Genevois et T. Nicolaieff. — Inhibition de la fermentation lactique bactérienne par les acides aliphatiques halogénés en α *C. R. Acad. Sc.*, **194**, 1270, 1932.

L. Genevois et T. Nicolaieff. — Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation lactique bactérienne *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1385, 1933.

A. Guilliermond, G. Mangenot et L. Plantefol. — Traité de cytologie végétale. Paris, Le François, 1933.

A. Guilliermond. — Nouvelles observations sur la structure des levures. *Microbiol. Journ. Leningrad.* **9**, 171, 1929. Sur la toxicité des colorants vitaux.*C. R. Soc. Biol.*, **104**, 1930.

Hahn F. L. et Walter. — Zur Kenntnis des Hexamethylentetramin. *B. d. D. G.*, **54**, 1531, 1911.

Harrisson St et Mellanby. — The inhibition of lactic acid and formation in cancer and muscle. *B. Z.*, **24**, 141, 1930.

K. Hinsberg, G. Holland. — Die Beeinflussung der Milchsäuregarüng in der Milch durch Monoiodessigsäure *Klin. Wosch.*, **11**, 1338, 8, 1932.

Ihlder. — Action de l'acide monochloracétique sur la triméthylamine. *Arch. Phar.*, **240**, 504, 1902.

H. I. Johansson. — Reaktions geschwindigkeiten bei Einwirkung werschiedenel basen anf halogen substituierte sauren. *Z. Phys. chem.*, **79**, 634, 1912.

J. H. Kastle et B. C. Beiser. — Sur la décomposition des sels des acides monochlore et monobromacétique. *Am. Chem. Journ.*, **15**, 441, 1893.

Kowski. — Uber gebromte Propionsäure. *Liebigs annalen*, **342**, 124, 1905.

Sergus Krapiwin. — Die Geschwindigkeit der reaktion Zwischen den Natrium salzen der Monobromesig un unterschwefligen saure. *Z. Phys. Chem.*, **82**, 439, 1913.

H. A. Krebs. — Uber die Wirkung der monoiodessigsunde auf den Zellstoffwchsel. *Biochem Z.*, **234**, 278, 1931.

Krondowski A., Mc Jazimiska Krontowska et H. P. Sawistza. — Action de ABr et AI sur le métabolisme des cellules et la croissance *in vivo* et *in vitro* des tissus normaux et des tumeurs *C. R. Soc. Biol., CIX*, 190, 1932.

A. N. Kuppanna. — Kinetischer salz effekt. *Journ. Indian Chemik Soc.*, **6**, 419, 1929.

V. K. La Mer. — *Am. Chem. Soc.*, **51**, 3341, 11, 1929.

Leblanc. — *Ann. de chim. et de Phys.* **10**, 1844, 212.

Locquin. — Action de l'hexaméthylènetétramine sur les éthers des acides chloro et bromacétique. *B. Soc. Ch.*, 3, **23**, 1, 660, 1900.

W. Lossen. — Beitrage zur kenntniss halogenuter aliphatischer säuren. *Liebigs Annalen*, **272**, 127, 1892. **342**, 112, 123, 1905.

E. Lundsgaard. — Die Monoiodessigsäurewirkung auf die enzymatische Kohlenhidratspaltung. *Biochem Z*, **220**, 1, 1930 ; **217**, 162, 1930.

E. Lundsgaard. — Uber die Ein Wirkung der Monoiodessigsaure auf den Spaltungs und oxydations stoffwechsel. *Biochem Z.*, **220**, 8, 1930.

E. Lundsgaard. — Weitere Untersuchungen uber die Einwirkung der Halogenessigsäuren auf den Spaldungs und oxydationsstoffwechsel. *Biochem Z.*, **250**, 61, 1932.

D. A. Mc Innes. — *Am. Chem. Soc.*, **50**, 2587, 10 1928.

O. Meyerhof et Ken Iwasaki. — Uber beeingflussung der Garungsgröbeund des oxydations quotietenden. der Hefe. *Biochem. Z.*, **226**, 16, 1930.

O. Meyerhof. — Chimie de la contraction musculaire traduit et annoté par L. Genevois. Hermann, Paris, 1932.

Neuberg et M. Kobel. — Fehlerquellen bei Verwendung von Sodessigräure als garungs hemmendes Agens. *Biochem Z.* **238**, 239, 1931.

Neuss F. — La pharmacologie de l'acide bromacétique. *Arch. exp. Pathol. Pharmak.*, **160**, 551, 1931.

R. Nilsson, K. Zeile, H. W. Euler. — Zur Kenntis der Monoiod und monobromessigsäure vergiftungen bei kohlenhydratablau. *Z. Physiol. Chem.*, **194**, 53, 1931.

Miguel Ozorio de Almeida et Thales Martin. — Indépendance de la rigidité produite par ABr et des excitations transmises par le nerf. *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 682, 1830. Respiration des muscles en état de rigidité produite par ABr, comparée à celle des muscles normaux. *Ibidem*, **104**, 684, 1930.

Penfold W. J. — The chemical Action on glucose of a variety of Bacillus Coli Communis (Escherich), obtain by cultivation in présence of a chloracétate. *Proc. R. Soc.* **85**, 415, 1912.

Perkin et Duppa. — *Chem. Soc. Quat. Journ.*, **11**, 122.

K. Iroskouriakoff. — Oxydation des acides halogénés par l'acide sulfurique. *Chemistry*, **33**, 717, 5, 1929.

J. H. Quastel. — Dehydrogenations produced by resting bacteria. IV, theory of the mecanisme of oxydation and reductions *in vivo*. *Bioch. Jour.*, **19**, 641, 1926.

H. Queré. — L'oxydation des alcools par les ferments acétiques considérés comme une forme de la respiration cellulaire. *C. R. Ac. Sc.*, **194**, 1270, 1932.

H. Queré. — Inhibition de la fermentation acétique par divers dérivés halogénés. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1388, 1933.

A. Rodoeff. — Inhibition de la fermentation alcoolique des végétaux supérieurs par l'acide monobromacétique et ses esters. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1393, 1933.

Ranberg L. — Sur les acides α monopropioniques. *Ann. Chem.* **370**, 231, 11, 1909.

P. Reiss. — Le pH intérieur cellulaire. Presses Universitaire, Paris, 1926.

Reiss et Haurowitz. — Ueber das Verhalten junger und alter Tiere bei Erstickung. *Klin Wsch.*, **8**, 743, 1929.

Rosenblatt et Rozenband. — Sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la fermentation alcoolique. *C. R. Ac. Sc.*, **149**, 309, 1909.

Ruby B. Moede. — The influence of acid iodacetic poisoning upon oxygen consumption of striated muscle. *Ann. Journ. of physiol.*, **103**, 94, 1933.

Scharrer K. et G. Claus. — Der Einfluss des Iods auf die CO^2 produktion gärunder Hefe. *Z. f. Mikrobiol.*, **1**, 143, 1930.

Schwartz et Oschmann. — Contribution au problème du mécanisme des constractures musculaires. Le taux de l'acide phosphorique musculaire libre dans les contractures des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *C. R. Soc. Biol.*, **91** 275, 1925.

Schwartz et Oschmann. — Le taux de l'acide lactique musculaire dans les contractures des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *Ibidem.*, **92**, 169, 1925.

Schwartz. — Le degré de tension et de raccourcissement musculaire contre les contractures des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 1396, 1925.

H. W. Smith et T. A. White. — The distribution ratios of some organic acids between Water and organic liquids. *Journ. of. Physic Chemi.*, **33**, 1953, 1929.

Senter G. — Displacement of halogens by hydroxyl. The hydrolytic decomposition of hydrogen and sodium monochloracetates by water and by alkali, and the influence of neutral salts on the reaction velocities. *Chem. Soc.*, **91**, 460, 1907.

Senter G. — Interaction of bromacetic α bromopropionic and α bromobutyric acids and their sodium salts with water and with alkali. *Chem. Soc.*, **95**, 1827, 11, 1909.

Senter G. et Fritz Bulle. — The influence of sodium salts of organic acids on the rate of hydrolysis bu alkali. *Chem. Soc.*, **101**, L, 2528, 1912.

SENTER G. et WOOD. — Interaction of alkali bromacetates and bromopionates in methylalcoholic solution *Chem. Soc.*, **107**, 1070, 7, 1915.

SENTER G. et WOOD. — Interaction of alkalis and alkali bromacetates and bromopropionates in éthyl alcoholic solution. *Ibidem.*, **109**, 681, 7, 1916.

SIMON Ernst. — Beobachtungen über garungs hemmung durch Halogenverbindungen. *Biochem. Z.* **253**, 218, 1932.

Arthur SLATOR. — The chemical Dynamies of the Reactions betwen sodium Thiosulfate and Organic Halogen Compounds. Halogen-substituted Acetates. *Chem. Soc.*, **87**, 481, 4, 1905.

SEMLKUS. — Ueber α brombuttesäure und Butodiglycosäure. *Liebigs Annalen*, **342**, 139, 1905.

O. WARBURG. — Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs. GENEVOIS et AUBEL, Paris, Alcan, 1928.

YAMASAKI Irue. — Ueber die Wirkung von CH^2ICO^2Na auf Teilfermente du Zimase und die Vergärung von Hexosediphosphat. *Biochem. Z.*, **228**, 123, 1930.

ZUCKERKANDTL et Luise MESSINER KLEBERMASS. — Ueber die Einwiskung Imingruppen bildender substanzen auf den Zuckerabbau durech Hefe. *Biochem. Z.*, **239**, 172, 1931.

INDEX ALPHABÉTIQUE DES CORPS ÉTUDIÉS

Abasine : acétylbromodiéthylacétylcarbamide ou acétyladaline.
Abrodil : monoiodeméthane sulfonate de Na.
Acétyladaline : voir abasine.
Acides aminés : Alanine.
Cystine Cystéine.
Acide acétique : CH^2BrCO^2H
CH^2ICO^2H
CH^2ClCO^2H
Acétates : voir bromacétates.
Acétones : voir bromacétones.
Acide propionique : $CH^3CHBrCO^2H$.
Propionate : voir bromopropionate.
Acide Oenanthylique : acide brome oenanthylique:
Acide succinique : mono et dibromé.
Acide valérianique : acide isobromovalérianique.
Acridine : voir rivanol.
Adaline : bromodiéthyacétylcarbamide v. carbromal et nyctal.
Alanine : voir acides aminés.
Albromal : bromoisovalérylurée v. bromural dormigène et isobromyl.
Alcool éthylique : alcool tribrométhylique v. avertine.
Aldéhydes : brome oenanthylique.
bromopropionique.
isobromovalérianique.
Allyle : bromure d'allyle.
Alylesulfourée : v. thiosinamine.
Amides : v. abasine, adaline, albromal, bromural, carbromal, dormigène, déclonal, isobromyl et nyctal.
Amines : Chlorhydrate de phénylènediamine.
chlorhydrate d'aniline.
Avertine : Alcool éthylique tribromé.
Bromacétates : Bromacétate de méthyle.
— — d'éthyle.
— — de prolyle.
— — d'octyle.
— — d'amyle.
— — de benzyle.
— — de phénéthyle.
— — de glycol.
— — d'éthylglycol.
— — de glycérol.
Bromacétique : v. acide.
Bromacétone.
Bromocrotonate d'éthyle.
Bromoisovalérianique : v. acides et aldéhydes.
Bromopropionique : v. acides.

Bromooenanthylique : v. acides et aldéhydes.
Bromures et Bromates.
Bromural : bromoisovalérylurée, v. albromane isobromyle et dormigène.
Bromopropionates : bromopionate de méthyle.
— — d'éthyle.
— — de propyle.
Carbromal : bromodiéthylacétylurée v. adaline nyctal.
Chloracétate : chloracétate de méthyle.
— — d'éthyle.
— — de propyle.
— — de benzyle.
— — de phénéthyle.
— — d'éthylglycol.
Chloracétique : v. acides.
Chloracétone.
Chloramine B : sel de Na de l'acide parasulfamide monochloré.
Crotonique : v. bromocrotonate d'éthyle.
Cystéine et cystine.
Declonal : Diéthylchloracétamine.
Dormigène : Bromoisovalérylurée v. albromane, bromural et isobromyl.
Esters : v. bromacétates et bromopropionates.
Iodacétique : v. acides.
Iodacétone.
Iodures et Iodates.
Iothone : diiodehydroxypropane.
Isobromyle : bromoisovalérylurée v. bromural, albromane et dormigène.
Nyctal : Bromodiéthylacétylurée v. adaline et carbromal.
Propioniques et Propionates : v. acides et bromopropionates.
Quinoléine : v. yatrène quinosol.
Quinosol : sulfate neutre d'oxyquinoléine.
Rivanol : Lactate de 2.éthoxy.6.9.diaminoacridine.
Rouge neutre.
Succinique : v. acides.
Sulfourée.
Thiosinamine.
Valérianique : v. acide.
Yatrène 105 : acide 7.iode.8.oxyquinoléinesulfonique.

Imprimerie et Lithographie Maurice DECLUME, Lons-le-Saunier.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ :

LES SPIRANES : PRÉPARATION, PROPRIÉTÉS, SÉPARATION DES INVERSES OPTIQUES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 22 Avril 1933

VU : LE RECTEUR,
Pour le Recteur,
Le Doyen délégué,
G. DUPONT.

VU :
Le Doyen,
G. DUPONT